



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

SYLVIA CAROLINA ALCÁZAR ALAY

**Otimização do Meio de Cultura para a Fermentação Direta
de Melaço de Cana para Produção de Ácido
Láctico por *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À FACULDADE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**RANULFO MONTE ALEGRE
Orientador**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Sylvia Carolina Alcázar Alay, aprovada pela comissão julgadora em 06/09/2011 e orientado(a) pelo Prof.(a) Dr. (a) Ranulfo Monte Alegre.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

AL16o Alcázar Alay, Sylvia Carolina
Otimização do meio de cultura para a fermentação direta de melaço de cana para produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* / Sylvia Carolina Alcázar Alay. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido láctico. 2. Melaço de cana. 3. Água de maceração de milho. 4. Lactobacillus. 5. Fermentação. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Optimization of medium for direct fermentation of sugarcane molasses for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*
Palavras-chave em inglês (Keywords):

Lactic acid

Sugarcane molasses

Corn steep liquor

Lactobacillus

Fermentation

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Alexandre Nunes Ponezi

Andreia Fonseca de Faria

Data da defesa: 06/09/2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
Membro

Dr. Andreia Fonseca de Faria
Membro

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
Membro

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
Membro

Agosto – 2011

**Dedico a todas as pessoas que contribuíram para o sucesso
desta etapa da minha vida**

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo;

A UNICAMP, e ao Departamento de Engenharia de Alimentos, por ter me acolhido durante o curso de mestrado e facilitarem a complementação de minha formação;

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre pela dedicação na orientação deste trabalho, pela compreensão, pelo incentivo e principalmente pelo companheirismo e amizade, muito obrigada;

Ao primeiro “inspirador” Ricardo Alcázar V. por ter me mostrado o mundo da pesquisa e, de todas as formas, ser responsável por eu estar aqui hoje;

Aos meus pais Raúl e Silvia, meus irmãos Raúl e Diego por todo o apoio em todas as etapas da minha vida, pelas palavras de carinho e incentivo que me fizeram superar as dificuldades e olhar a vida de um jeito feliz;

A minhas madrinhas Amelia, Margarita e Luisa, pelo apoio, carinho e incentivo durante todas as etapas da minha vida;

A Claudinha, César, Renato, Priscila, Meire, Bruna, Luana, Osvaldo e dona Maria, pela amizade, carinho, auxílio na execução deste trabalho e pela paciência durante todos os dias no laboratório;

Aos meus amigos Angela, Noelia, Júlio, Helmut, Mario, Frank, Fiorella, Yaneth, Jenny, Mirko, Hilka, Efraín, Luigina e tantos outros que sempre estiveram ao meu lado nas horas boas e nas horas difíceis da minha vida, no Perú e no Brasil, amo vocês.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões que melhoraram este trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	3
2.1. Acido Láctico	3
2.2. Aplicações do ácido láctico	5
2.3. Produção de ácido láctico	7
2.3.1. Meios de cultura.....	7
2.3.2. Microrganismos produtores de ácido láctico	9
2.3.3. Métodos Fermentativos	12
2.3.4. Investigação na produção de ácido láctico	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Estudo preliminar	21
3.1.1. Seleção da linhagem melhor produtora	21
3.2. Produção de ácido láctico	22
3.2.1. Preparo do inóculo.....	22
3.2.2. Fermentação.....	23
3.2.3. Planejamento experimental	23
3.3. Metodologia analítica	27
3.3.1. Determinação do ácido láctico	27
3.3.2. Determinação da biomassa seca.....	28
3.3.3. Determinação de açúcares redutores totais (ART)	28

3.3.4. Determinação do pH	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1. Ensaio preliminares: análise dos microrganismos produtores e curvas de produção de ácido láctico e biomassa seca, consumo de sacarose e pH	30
4.1.1. Seleção da linhagem melhor produtora	33
4.2. Planejamento fracionado 2^{5-1} usando melaço de cana como fonte de carbono	34
4.2.1. Resultados dos ensaios	34
4.2.2. Análise estatística	36
4.3. Primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de ácido láctico	38
4.3.1. Resultados dos ensaios	38
4.3.2. Análise estatística	39
4.3.3. Determinações analíticas	44
4.4. Segundo delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de ácido láctico	47
4.4.1. Resultados dos ensaios	48
4.4.2. Análise estatística	50
4.4.3. Determinações analíticas	55
4.5. Terceiro delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de ácido láctico	58
4.5.1. Resultados dos ensaios	58
4.5.2. Análise estatística	59
4.5.3. Determinações analíticas	64
5. CONCLUSÕES	68

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7. ANEXOS	76
7.1. Curva padrão	76
7.1.1. Sacarose.....	76
7.1.2. Ácido láctico.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas opticamente ativas do ácido láctico, L-(+)- Ácido láctico D-(-)- Ácido láctico.	3
Figura 2: Vias metabólicas (linha sólida) homofermentativas e heterofermentativas (linha pontilhada), das bactérias ácido lácticas.	11
Figura 3: Produção de ácido láctico durante processo fermentativo para as linhagens de bactérias ácido lácticas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ATCC 4797 após 72 horas...	30
Figura 4: Concentração de sacarose residual após 72 horas da produção de ácido láctico durante processo fermentativo para as linhagens de bactérias ácido lácticas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ATCC 4797.....	31
Figura 5: Concentração de biomassa celular após 72 horas da produção de ácido láctico durante processo fermentativo para as linhagens de bactérias ácido lácticas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ATCC 4797.....	31
Figura 6: Valor de pH do meio de cultivo após 72 horas da produção de ácido láctico para as linhagens de bactérias ácido lácticas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842 e <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ATCC 4797.	32
Figura 7: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais.....	41
Figura 8: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL ⁻¹) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	43
Figura 9: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL ⁻¹) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	43
Figura 10: Produção de ácido láctico durante o processo fermentativo para os ensaios do primeiro DCCR (2 ²)	44

Figura 11: Concentração de sacarose residual após a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo dos ensaios do primeiro DCCR (2^2)	45
Figura 12: Concentração de biomassa seca após a produção de ácido láctico durante processo fermentativo dos ensaios do primeiro DCCR (2^2)	45
Figura 13: Valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico nos ensaios do primeiro DCCR (2^2)	46
Figura 14: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais.....	51
Figura 15: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	53
Figura 16: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	53
Figura 17: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e peptona por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	54
Figura 18: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e peptona por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	54
Figura 19: Produção de ácido láctico durante o processo fermentativo para os ensaios do segundo DCCR (2^3)	56
Figura 20: Concentração de sacarose residual após a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo dos ensaios do segundo DCCR (2^3)	56
Figura 21: Concentração de biomassa seca após a produção de ácido láctico durante processo fermentativo dos ensaios do segundo DCCR (2^3)	57
Figura 22: Valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico nos ensaios do segundo DCCR (2^3)	57
Figura 23: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais.....	61

Figura 24: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	63
Figura 25: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	63
Figura 26: Produção de ácido láctico durante o processo fermentativo para os ensaios do terceiro DCCR (2^2)	65
Figura 27: Concentração de sacarose residual após a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo dos ensaios do terceiro DCCR (2^2)	65
Figura 28: Concentração de biomassa seca após a produção de ácido láctico durante processo fermentativo dos ensaios do terceiro DCCR (2^2)	66
Figura 29: Valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico nos ensaios do terceiro DCCR (2^2).	66
Figura 30: Curva padrão de Sacarose	76
Figura 31: Curva padrão de Ácido láctico	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Conteúdo de aminoácidos na água de maceração de milho.....	9
Tabela 2: Composição do meio de cultura sólido para bactérias	21
Tabela 3: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}	24
Tabela 4: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro delineamento composto central rotacional (2^2)	25
Tabela 5: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo delineamento composto central rotacional (2^3)	26
Tabela 6: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no terceiro delineamento composto central rotacional (2^2)	27
Tabela 7: Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} (contendo valores reais e codificados) com as respostas de ácido láctico (gL^{-1}) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	35
Tabela 8: Efeito dos fatores estudados no planejamento fracionado 2^{5-1} para produção de ácido láctico (gL^{-1}) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.....	36
Tabela 9: Matriz do primeiro DCCR contendo valores reais e codificados das variáveis, resposta sobre a produção de ácido láctico (gL^{-1}), valores preditos pelo modelo e desvios relativos.	39
Tabela 10: Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido láctico (gL^{-1}) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.	40
Tabela 11: ANOVA do modelo quadrático para predição da produção de ácido láctico (gL^{-1}) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.	42
Tabela 12: Matriz do segundo DCCR contendo valores reais e codificados das variáveis, resposta sobre a produção de ácido láctico (gL^{-1}), valores preditos pelo modelo e desvios relativos.	49
Tabela 13: Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido láctico (gL^{-1}) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.	50

Tabela 14: ANOVA do modelo linear para predição da produção de ácido láctico (g ^L ⁻¹) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.	52
Tabela 15: Matriz do terceiro DCCR contendo valores reais e codificados das variáveis, resposta sobre a produção de ácido láctico (g ^L ⁻¹), valores preditos pelo modelo e desvios relativos.	59
Tabela 16: Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido láctico (g ^L ⁻¹) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.	60
Tabela 17: ANOVA do modelo quadrático para predição da produção de ácido láctico (g ^L ⁻¹) por <i>Lactobacillus delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842.	61

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AUTOR: Sylvia Carolina Alcázar Alay

TÍTULO: Otimização do Meio de Cultura para a Fermentação Direta de Melaço de Cana para Produção de Ácido Láctico por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

ORIENTADOR: Dr. Ranulfo Monte Alegre - DEA/FEA/UNICAMP

RESUMO

O interesse pela produção de ácido láctico tem crescido fortemente nos últimos anos desde a descoberta das propriedades de seus polímeros, os que apresentam características de biodegradabilidade e biocompatibilidade; e sua aplicação como solvente “verde” ou ambientalmente saudável para os processos de misturas de solventes na indústria química. Dado o potencial econômico do ácido láctico, são necessários processos mais eficazes para sua síntese e redução dos custos de produção. Este trabalho visou aperfeiçoar o processo de produção fermentativa do ácido láctico, determinando formulações do meio de cultura que auxiliarão no desenvolvimento de tecnologias competitivas de produção. Além disso, esse trabalho propõe a utilização de matérias-primas de baixo custo e grande disponibilidade no mercado brasileiro como por exemplo melaço de cana e água de maceração de milho. A espécie selecionada para o estudo foi *Lactobacillus delbrueckii*, duas linhagens foram estudadas, selecionando-se a que apresentou maior velocidade de crescimento e produção de ácido láctico no meio de cultura padrão. O estudo de otimização da produção de ácido láctico foi realizado utilizando a estratégia de planejamentos experimentais. O uso de melaço de cana e água de maceração de milho como fonte de carbono e nitrogênio, em concentração de 240 gL⁻¹ e 14 gL⁻¹ respectivamente, possibilitou produtividade de até 57,17 gL⁻¹ após 96 horas, com eficiência de 82% (gramas de ácido láctico produzido / grama de substrato utilizado)

MASTER THESIS

AUTHOR: Sylvia Carolina Alcázar Alay

TITLE: Optimization of medium for direct fermentation of sugarcane molasses for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*.

MAJOR PROFESSOR: Dr. Ranulfo Monte Alegre - DEA/FEA/UNICAMP

ABSTRACT

The interest in lactic acid has grown strongly in the last years since the discovery of its properties of application in production of biodegradable and biocompatible polylactate polymers and their application as "green solvent" or "safety solvent" to processes of mixtures of solvents in the chemical industry. Considering the commercial potential of lactic acid, more efficient processes are needed for its synthesis, reducing costs of production and turning its industrial application more attractive, as its cost still prevents it from being used in some areas. This work aimed at improving the process of fermentative lactic acid production, determining formulations that will help develop competitive technologies of production. Furthermore, the use of low cost raw materials, easily available on the Brazilian market, such as sugarcane molasses and corn steep liquor is proposed. The species selected for the study was *Lactobacillus delbrueckii*, two strains were studied, *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus*, shown the greatest growth speed and lactic acid production in the standard culture medium. The optimization study of lactic acid production was performed using the strategy of experimental design, using sugarcane molasses as a carbon source and corn steep liquor as a nitrogen source allowed a productivity of up to 57,17 gL⁻¹ after 96 hours, with 82% lactic acid yield efficiency (g lactic acid produced / g substrate utilized) using an initial concentration of 240 gL⁻¹ and 14 gL⁻¹ of sugarcane molasses and corn steep liquor respectively.

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é considerado um dos ácidos orgânicos mais amplamente utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética, têxtil e química. Atualmente sua produção vem atraindo grande número de pesquisas e desenvolvimento devido à emergente aplicação na produção de polímeros de polilactato, que apresentam características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. O ácido láctico também tem sido aplicado com objetivo de melhorar as propriedades físicas de sacos de lixo e folhas de plástico agrícola, como componente de fibras, filmes e peças de computadores pessoais e de carros.

O ácido láctico pode ser obtido por processos químicos ou fermentativos. A síntese química requer insumos produzidos por processos petroquímicos, no entanto o processo de fermentação requer substratos provenientes de recursos renováveis, incluindo açúcares, amido e lignocelulose. Os processos fermentativos apresentam significativa vantagem sobre a síntese química, devido à limitada disponibilidade de matérias-primas advindas do petróleo no futuro.

O ácido láctico pode ser produzido usando bactérias e fungos. As bactérias ácido lácticas produtoras de ácido láctico, têm recebido grande atenção devido à sua elevada taxa de crescimento e rendimento do produto. No entanto, as bactérias ácido lácticas possuem necessidades complexas de nutrientes devido à sua limitada capacidade de sintetizar vitaminas do complexo B e aminoácidos.

Portanto faz-se necessário suplementar o meio de cultivo com estes requerimentos nutritivos, o que encarece o processo e aumenta o custo total de produção.

Assim, são necessários novos estudos para selecionar componentes nutricionais mais baratos visando a redução dos custos e aumento da produtividade do ácido láctico. Uma das alternativas é a utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos para a produção de compostos de

interesse industrial por via biotecnológica. O melaço de cana é um subproduto da indústria de açúcar, com alto conteúdo em açúcares fermentáveis. A água de maceração de milho (AMM) é o subproduto da moagem úmida de milho e pode ser utilizado como co-nutriente para a produção de ácido láctico. AMM é uma excelente fonte de nitrogênio para a maioria dos microrganismos, pois é rica em aminoácidos e polipeptídios, contendo quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B.

O objetivo fundamental deste trabalho foi otimizar a formulação de meio de cultura para a produção de ácido láctico a partir de substratos de baixo custo.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. Acido Láctico

O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropanóico, $C_3H_6O_3$) é o ácido carboxílico mais amplamente encontrado na natureza. Foi descoberto pelo químico sueco Carl Wilhem Scheele em 1780, mas foi produzido comercialmente pela primeira vez por Charles E. Avery em Littleton-Massachusetts nos EUA em 1881. O ácido láctico é um ácido orgânico de três carbonos: um átomo de carbono terminal faz parte de um grupo ácido ou carboxílico, o outro carbono terminal faz parte de um grupo metil ou hidrocarboneto e o carbono central contém um grupo álcool (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

O ácido láctico existe em dois isômeros opticamente ativos como mostra a Figura 1:

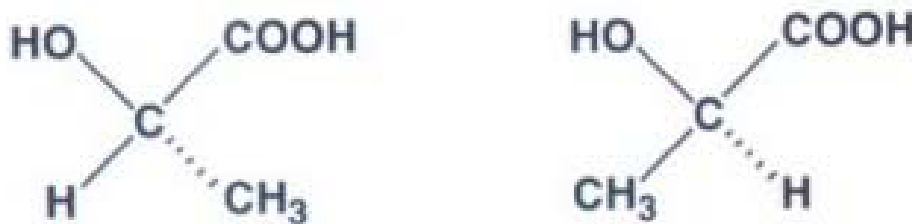


Figura 1: Estruturas opticamente ativas do ácido láctico, L-(+)- Ácido láctico D-(-)- Ácido láctico.

Fonte: NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004.

O ácido láctico pode ser obtido por síntese química ou fermentação de carboidratos. O processo para a síntese química, onde cianeto de hidrogênio é

adicionado ao acetaldeído na presença de base para produzir lactonitrilo. Esta reação ocorre em fase líquida a alta pressão. O lactonitrilo bruto é recuperado e purificado por destilação. Esse composto é então hidrolisado a ácido láctico na presença de HCl ou H₂SO₄ concentrado para produzir o sal de amônio correspondente e ácido láctico. O ácido láctico é então esterificado com metanol para a produção de lactato de metila, que é removido e purificado por destilação e hidrolisado pela água sob catalisador ácido para a produção de ácido láctico e do metanol, que é reciclado (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

O método de síntese química produz uma mistura racêmica de ácido láctico. Outras rotas possíveis são a degradação catalisada de açúcares, oxidação de propileno glicol, a reação de acetaldeído, monóxido de carbono e água a temperaturas e pressões elevadas, a hidrólise do ácido cloropropiônico, fermentação de carboidratos, a oxidação do ácido nítrico pelo propileno. Nenhuma destas rotas se mostraram técnica e economicamente viáveis para processos industriais (DATTA et al., 1995; NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

Enquanto a síntese química produz uma mistura-racêmica, a fermentação de carboidrato pode gerar um estereoisômero-específico, dependendo do microrganismo utilizado. Por isso, a via fermentativa de produção de ácido láctico tornou-se objeto de uma grande atenção por parte dos pesquisadores, devido à necessidade de se obter ácido láctico opticamente puro para a síntese do polímero de ácido láctico altamente cristalino. O meio contendo lactato de cálcio (tratado previamente com hidróxido de cálcio) é filtrado para remover as células, tratado com carvão ativado, concentrado e acidificado com ácido sulfúrico para obter ácido láctico e sulfato de cálcio. O sulfato de cálcio insolúvel é removido por filtração. O ácido láctico é então purificado por um processo de esterificação, hidrólise, destilação e hidrólise (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004; SÖDERGÅRD; STOLT, 2002).

O ácido láctico por possuir dois grupos funcionais reativos (grupo carboxila (-COOH) e grupo hidroxilas (-OH)) pode ser potencialmente utilizado como uma substância química fundamental para a produção de diversos produtos químicos industriais, incluindo lactato de etila, propileno glicol, 2,3-pentanodiona, ácido propanóico, ácido acrílico, acetaldeído e dilactídeo. (VARADARAJAN; MILLER, 1999)

O consumo mundial de ácido láctico foi estimado em cerca de 130.000-150.000 toneladas métricas por ano, o que tenderá a se incrementar consideravelmente no futuro próximo, como resultado de uma rápida expansão da aplicação do polilactato nos mercados de polímeros biodegradáveis (WEE; KIM; RYU, 2006).

2.2. Aplicações do ácido láctico

O ácido láctico é usado como acidulante, aromatizante, agente tamponante ou inibidor de deterioração bacteriana em ampla variedade de alimentos processados. Em contraste com alimentos ácidos, apresenta sabor levemente ácido. É inodoro, não volátil e é classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and drug administration*). É um agente conservante e mostra boa decapagem (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

Os ésteres de ácido láctico são usados como agentes emulsificantes em produtos de padarias. A fabricação destes emulsificantes exige a propriedade de termo-estabilidade do ácido láctico, portanto, apenas moléculas termicamente estáveis podem ser utilizadas para esta aplicação (DATTA et al., 1995).

Ácido láctico de grau técnico é usado como acidulante na indústria de vegetais e de curtimento de couro. Na indústria têxtil o ácido láctico é requerido nas operações finais, onde é possível usá-lo como sustância com baixo grau técnico, para competir com outros ácidos orgânicos mais baratos (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

O ácido láctico é aplicado em pequena escala em banhos de proteção para ajuste de pH nos celofanes utilizados em embalagens de alimentos, litografia e impressão têxtil, na formulação de adesivos, galvanoplastia, banhos de eletropolimento e constituinte de detergentes (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

O ácido láctico apresenta muitas aplicações na indústria farmacêutica e cosmética, como por exemplo, nas formulações de pomadas, loções, soluções anti-acne, umectantes, soluções parenterais e aplicações de diálise, como agente anti carregante. A capacidade de retenção de água do ácido láctico o torna adequado para uso como hidratante em formulações cosméticas. O ácido láctico tem a qualidade de suprimir a formação de tirosinase, podendo ser utilizado em processos de clareamento e rejuvenescimento da pele. Como umectantes, os lactatos são muitas vezes superiores aos produtos naturais e mais eficazes que os poli álcoois (DATTA et al., 1995; NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

O lactato de cálcio pode ser usado para o tratamento da deficiência de cálcio e agente enticáreis. Seu polímero biodegradável tem aplicações médicas como suturas e implantes ortopédicos. Estes polímeros são transparentes e sua degradação pode ser controlada pelo ajuste da composição e peso molecular. Suas propriedades são aproveitadas na indústria de plásticos e derivados do petróleo (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

Ésteres de ácido láctico como etil ou butil lactato podem ser utilizados como solventes verdes. Eles são componentes de alto ponto de ebulição, não-tóxicos e biodegradáveis. O ácido poliláctico, de baixo grau de polimerização pode ajudar na fabricação de filmes degradáveis em grande escala, aplicados na agricultura (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

2.3. Produção de ácido láctico

2.3.1. Meios de cultura

Uma série de estudos sobre os nutrientes necessários para a fermentação láctica chegou à conclusão que entre as várias fontes de nitrogênio complexas, o extrato de levedura é a melhor escolha para o crescimento microbiano e a produção de ácido láctico. No entanto, para a produção de ácido láctico como fonte de produtos químicos ou commodities, o uso de extrato de levedura não é eficaz para a redução dos custos de produção (KWON et al., 2000; ALTAF; NAVEENA; REDDY, 2007).

As matérias-primas necessárias para produção de ácido láctico industrial devem atender diversos requisitos, entre eles baixo custo, baixos níveis de contaminantes, taxa de fermentação rápida, alta produção de ácido láctico, pouco ou sem formação de outros produtos e disponibilidade consistente para a indústria (WEE; KIM; RYU, 2006; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

O custo da matéria-prima é um dos principais fatores a serem considerados na produção de ácido láctico. A eficiência e custo dos substratos são dois fatores que desempenham um papel vital na formulação de meios de cultura para produção de ácido láctico. A produção biotecnológica de ácido láctico, além de gerar produtos de alta especificidade, pois produz uma substância opticamente pura de L-(+) ou D-(-) ácido láctico, oferece várias vantagens em comparação com a síntese química, como a possibilidade de uso de substratos de baixo custo, produção em baixa temperatura e baixo consumo de energia (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

São necessárias matérias-primas baratas para uma produção economicamente viável de ácido láctico, pois a indústria de polímeros e outros produtores industriais geralmente requerem grandes quantidades de ácido láctico a custo relativamente baixo (JOHN et al., 2009).

Os resíduos agroindustriais são fontes renováveis de energia, e representam aproximadamente 3,5 bilhões de toneladas de resíduos agrícolas que

são produzidos por ano no mundo. O uso destas como fontes de carbono, depende de seu preço, disponibilidade e pureza. A maioria dos resíduos agroindustriais são ricos em carboidratos, mas sua utilização é limitada devido a presença de proteínas de baixa digestibilidade e de resíduos celulósicos (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007).

As possíveis fontes de carbono para a fermentação do ácido láctico incluem glicose, sacarose de cana ou de beterraba, açúcares provenientes de melaços e soro de queijo (em que a lactose é seu principal constituinte), amido, fécula de milho, trigo o batata e material lignocelulósico (sabugo e talhos de milho, palhas, bagaço de mandioca). Os açúcares refinados são geralmente caros, mas facilitam o processo de purificação; substratos alternativos como o melaço são baratos, mas a grande quantidade de impurezas pode afetar o processo. (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004; JOGLEKAR et al., 2006; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; KWON et al., 2000).

CARDINAL; HEDRICK (1948) pesquisaram as características da água de maceração de milho, uma vez que este subproduto tem desempenhado papel importante na produção de penicilina. Os investigadores avaliaram sistematicamente seus componentes nitrogenados. Os resultados das análises da água de maceração de milho estão mostrados na Tabela 1. O teor de nitrogênio total é quase totalmente devido a amônia e aminoácidos, sendo a grande proporção do nitrogênio representada por alanina, ácido glutâmico e arginina, de grande interesse industrial. O conteúdo de alanina representa mais de um quarto do conteúdo do nitrogênio total.

Tabela 1: Conteúdo de aminoácidos na água de maceração de milho

Aminoácido	Conteúdo de Nitrogênio (%)
Leucina	5.86
Isoleucina	3.40
Valina	3.88
Ácido glutâmico	7.97
Treonina	3.44
Lisina	3.97
Histidina	6.78
Arginina	8.23
Prolina	4.75
Fenilalanina	2.05
Metionina	1.07
Ácido aspártico	1.68
Cistina	1.22
Alanina	27.70
Tirosina	0.74
Amonia*	12.07
Total	95.44

Fonte: CARDINAL; HEDRICK, 1948.

2.3.2. Microrganismos produtores de ácido láctico

O ácido láctico pode ser produzido por bactérias e fungos. As bactérias ácido lácticas produtoras de ácido láctico, têm recebido grande atenção devido à sua elevada taxa de crescimento e rendimento do produto. Contudo, a natureza fastidiosa das bactérias lácticas ainda é o principal entrave para a viabilidade econômica do processo de fermentação. A maioria das bactérias do ácido láctico

requer ampla gama de fatores de crescimento, incluindo os aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, purinas e pirimidinas para o seu crescimento e atividade biológica (NANCIB et al., 2001).

A característica desejável de microrganismos industriais é a sua capacidade de fermentar rápida e completamente as matérias-primas de menor custo. Isso requer uma quantidade mínima de substâncias nitrogenadas para obter rendimentos elevados de ácido láctico em valores reduzidos de pH baixo e elevada temperatura, produção de pequenas quantidades de massa celular e quantidades insignificantes de outros subprodutos (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

A escolha do organismo depende principalmente da fonte de carbono a ser fermentada. *Lactobacillus delbreuckii* spp. *delbreuckii* é capaz de fermentar a sacarose; *Lactobacillus bulgaricus* spp. *delbreuckii* é capaz de usar lactose; *Lactobacillus helveticus* é capaz de usar tanto lactose e galactose; *Lactobacillus amylophylus* e *Lactobacillus amylovirus* são capazes de fermentar amido. *Lactobacillus lactis* pode fermentar glicose, sacarose e galactose. *Lactobacillus pentosus* tem sido utilizado para fermentação do licor de resíduos sulfatados. Estudos também têm sido feitos com *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* para a produção de L-(+)-ácido láctico puro devido à sua capacidade de tolerar alta concentração de íons de hidrogênio (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

As bactérias lácticas podem ser classificadas em dois grupos: homo e heterofermentativas. Enquanto as homofermentativas convertem glicose quase que exclusivamente em ácido láctico, as heterofermentativas catabolizam glicose em etanol e CO₂, bem como em ácido láctico. As bactérias ácido lácticas homofermentativas utilizam a via glicolítica de Embden-Meyerhof, convertendo glicose em ácido láctico, onde 2 moles de ácido láctico são formados para cada mol de glicose fermentado. De outro lado bactérias ácido lácticas heterofermentativas convertem glicose resultando em vários produtos (ácido láctico,

oxalacético e fórmico). Somente as bactérias homofermentativas estão disponíveis para a produção comercial de ácido láctico (WEE; KIM; RYU, 2006).

Ambos os tipos de fermentação se mostram na figura Vias metabólicas homofermentativas e heterofermentativas das bactérias ácido lácticas.

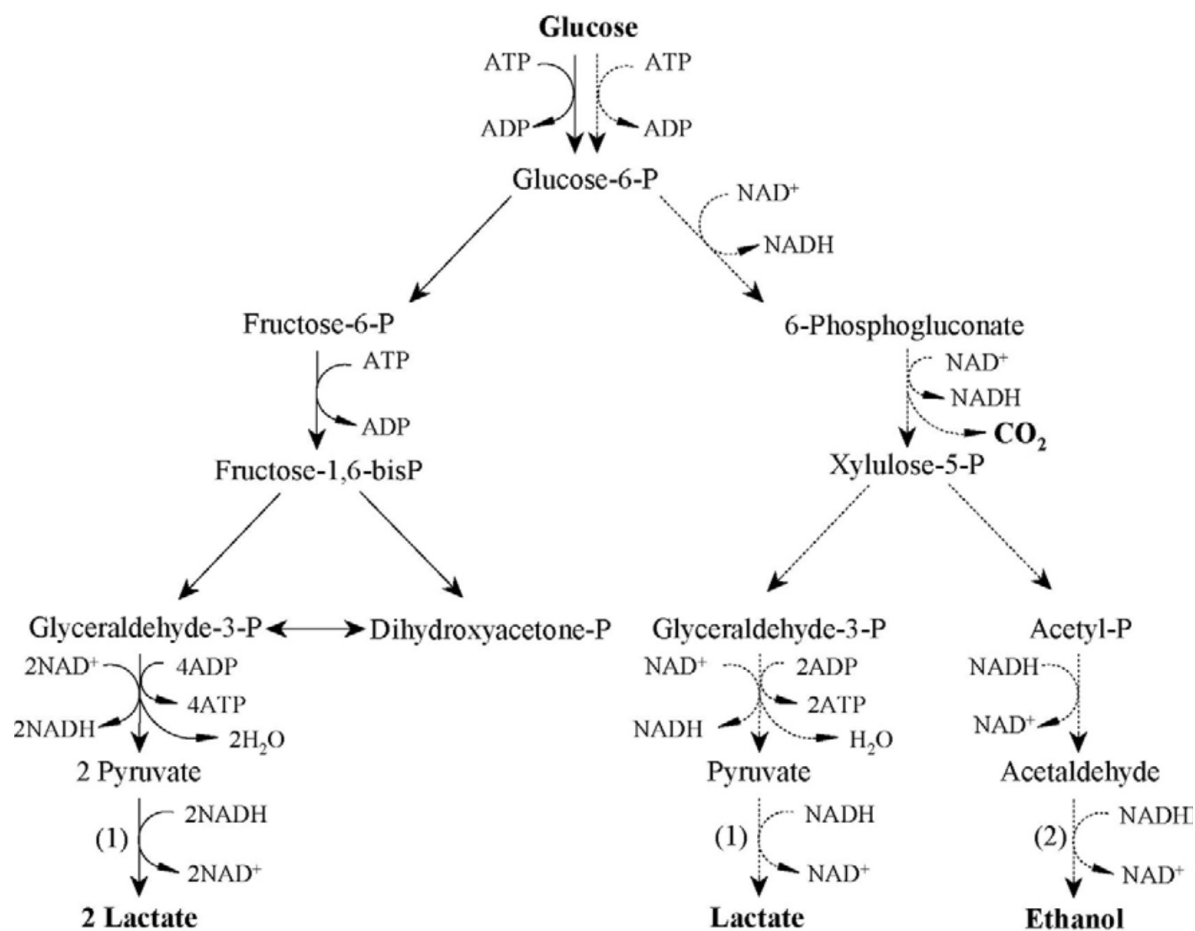


Figura 2: Vias metabólicas (linha sólida) homofermentativas e heterofermentativas (linha pontilhada), das bactérias ácido lácticas.

P, fosfato; ADP, adenosina 5'-difosfato; ATP, adenosina 5'-trifosfato; NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleótido; NADH, nicotinamida adenina (forma reduzida); lactato desidrogenase (1), álcool desidrogenase (2).

Fonte: WEE; KIM; RYU, 2006.

2.3.3. Métodos Fermentativos

O ácido láctico pode ser produzido pela fermentação de açúcares, hidrolisados contendo açúcar, conversão de amido numa única etapa, fermentação de resíduos celulósicos por conversão direta com enzima amilolítica produzida por microrganismos ou pela hidrólise e fermentação simultânea com a adição concomitante de enzimas sacaríferas e inóculo (JOHN et al., 2009).

Geralmente, é utilizado substrato hidrolisado em vez de açúcares refinados, que podem ser utilizados para a fermentação submersa ou fermentação em estado sólido. A concentração de açúcares redutores no hidrolisado afeta a fermentação, as células bacterianas deixam de produzir ácido láctico quando a concentração de açúcar é elevado. A conversão de amido ou celulose em açúcar consome energia durante a liquefação ou sacarificação e aumenta o custo de produção (JOHN et al., 2005; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2006; JOHN et al., 2009).

WOICIECHOWSKI et al. (2002) estudaram a hidrólise do bagaço de mandioca e amido por hidrólise ácida e enzimática. Eles relataram que ambos métodos são bastante eficientes quando se considera como parâmetro a percentagem de hidrólise, tempo ou custo dos produtos químicos e consumo de energia. Mesmo que a hidrólise ácida produza ácido láctico em tempo reduzido e tenha custo efetivo, haverá uma etapa de neutralização após hidrólise ácida que criará um aumento desnecessário de sais no meio e isso afetará o crescimento microbiano e produção de ácido láctico. A hidrólise enzimática produz uma elevada porcentagem de açúcares redutores de bagaço de mandioca, no entanto o custo das enzimas e energia durante o tempo de sacarificação podem inviabilizar a aplicação desse método. A fermentação direta reduz o custo relativo ao consumo de energia nas etapas de liquefação e sacarificação permitindo a aplicação desse processo para a produção de ácido láctico.

2.3.4. Investigação na produção de ácido láctico

HUJANEN; LINKO (1996) testaram onze diferentes fontes de nitrogênio para a fermentação do ácido láctico (extrato de levedura, extrato de malte, peptonas, extrato de erva, “NZ case plus”, água de maceração de milho, NZ-amina YT, hidrolisado de caseína, resíduos de destilaria, fosfatos de amônio e ureia). Eles tiveram sucesso na fermentação obtendo de 70-90 gL⁻¹ de ácido láctico reduzindo o uso de extrato de levedura de 22 gL⁻¹ até 4 gL⁻¹ quando 100 gL⁻¹ de malte de cevada foram adicionadas ao meio.

KWON et al. (2000) usaram hidrolisado de soja como fonte de nitrogênio, visando a substituição completa do extrato de levedura no meio. A soja é inferior ao extrato de levedura no teor de vitamina, mas apresenta preço mais baixo, o que é uma vantagem para um processo de produção mais econômica de ácido láctico, se o custo para a suplementação do meio com vitaminas é desprezível. Assim, realizaram uma investigação detalhada sobre a suplementação de vitaminas na produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus* utilizando hidrolisado de soja como única fonte de nitrogênio; demonstrando a importância da biotina, piridoxina e riboflavina para o processo fermentativo.

NANCIB et al. (2001) estudaram a produção de ácido láctico a partir da fermentação de concentrado de tâmara, por *Lactobacillus casei ssp. Rhamnosus*, analisando os efeitos de fontes nitrogenadas em termos de eficiência na produção de ácido láctico. As fontes nitrogenadas testadas foram peptona, água de maceração de milho, ureia, sulfato de amônia e extrato de levedura. Neste estudo, conclui-se que nenhuma das fontes de nitrogênio testadas superaram a eficiência do extrato de levedura, que apresentou rendimento de 46 gL⁻¹ de ácido láctico, com concentração inicial de substrato de 60 gL⁻¹ (glicose) e de extrato de levedura de 20 gL⁻¹, a concentração de açúcares residuais foi de 4,6 gL⁻¹.

HAULY; OLIVEIRA, A.R.; OLIVEIRA A.S. (2003) utilizaram a metodologia da superfície de resposta para estabelecer as melhores condições, relativas às concentrações, do meio de cultivo contendo melaço de cana, extrato de levedura e peptona para desenvolvimento da fermentação descontínua por *Lactobacillus*

curvatus. Desenvolveram a fermentação durante 48 horas a 37 °C. O modelo matemático forneceu os valores máximos de concentração testados para melaço de cana (100 gL⁻¹), extrato de levedura (20 gL⁻¹) e peptona (40 gL⁻¹) como a melhor composição do meio para produção de ácido láctico. Nestas condições, a produção de ácido láctico foi de 30,5 gL⁻¹, sendo este resultado comparado ao obtido em meio sintético de Man-Rogosa-Sharpe, o qual produziu 32,0g/L de ácido láctico.

YUN; WEE; RYU (2003) investigaram a produção de ácido láctico por *Enterococcus faecalis* RKY1 a partir de vários carboidratos. Quando *Enterococcus faecalis* RKY1 foi cultivado em meio de cultivo contendo glicose, frutose e maltose, o ácido láctico foi produzido com um rendimento elevado por meio do metabolismo homofermentativo. Durante a fermentação do ácido láctico com a glicose, frutose ou maltose como fonte de carbono, as produtividades volumétricas médias variaram entre 5,2 e 6,0 gL⁻¹h⁻¹ com a produção de ácido láctico de 0,96 gramas por grama de fonte de carbono. Além disso, o ácido láctico produzido a partir da glicose, frutose e maltose por *E. faecalis* RKY1 era quase opticamente puro L- (+)-ácido láctico (mais de 99% do ácido láctico total produzido). Por isso, *E. faecalis* RKY1 foi determinado pelos investigadores como um excelente microrganismo para a produção de L-(+)-ácido láctico com alta pureza através da via homofermentativa.

NARITA et al. (2006) estudaram a fermentação de amido de milho cru por *Streptococcus bovis* 148, a bactéria foi capaz de produzir L-(+)-ácido láctico diretamente do substrato solúvel. A produtividade foi maior a 37 °C, com 14,7 gL⁻¹ de ácido láctico produzido a partir de 20 gL⁻¹ de amido de milho cru. A pureza óptica e rendimento de L-(+)-ácido láctico foram de 0,88 e 95,6%, respectivamente.

OH et al. (2005) relataram a utilização de recursos agrícolas, tais como cevada, trigo e milho, os quais foram hidrolisados por enzimas amilolíticas comerciais, para a produção de ácido láctico por *Enterococcus faecalis* RKY1. Apesar de nenhum nutriente ter sido acrescentado, a maior produtividade de ácido

lático foi de $0,8 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ a partir de cevada e trigo, com o máximo de biomassa seca de $2,3 \text{ gL}^{-1}$. Quando farinha de trigo integral (200 gL^{-1}) foi hidrolisada por enzimas amilases após o pré-tratamento com 0,3% (v/v) de ácido sulfúrico e esterilizados por filtração, *E. faecalis* RKY1 elevou sua produtividade a $2,6 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e o peso máximo de biomassa seca para $5,90 \text{ gL}^{-1}$. Logo, esta produtividade foi comparada ao meio com nutrientes contendo 200 gL^{-1} de hidrolisado de farinha de trigo integral, 15 gL^{-1} de água de maceração de milho e $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de extrato de levedura. Assim a produtividade de ácido lático e a biomassa seca foram obtidos em $5,36 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $14,08 \text{ gL}^{-1}$ respectivamente. Este resultado representou uma melhoria de até 106% na produtividade de ácido lático e 138% na biomassa seca máxima em comparação com a fermentação de hidrolisado de farinha de trigo integral apenas.

ALTAF; NAVEENA; REDDY (2006) estudaram a fermentação ácido láctica de amido por *Lactobacillus amylophilus* GV6 sob a influência de fontes de nitrogênio de baixo custo (lentilha vermelha e células de levedura para panificação) com a intenção de substituir no meio a peptona e o extrato de levedura. A metodologia de estudo foi o delineamento composto central rotacional (DCCR) a que foi empregada para determinar a produção máxima de ácido lático e os valores ótimos para cada variável do processo (concentração de lentilha vermelha, concentração de células de levedura de panificação e período de incubação). Determinou-se que a produção de ácido lático foi significativamente afetada pelas interações das células de levedura de panificação e o período de incubação. A concentração de lentilha foi definida como sendo de 0,8% (p/p), as células de levedura para panificação em 1% (p/p) e o período de incubação de 48h, resultando em eficiência de produção de ácido lático de 92% (grama ácido lático produzido / grama substrato utilizado).

JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY (2006) propuseram um processo viável baseado em um meio alternativo a produção de L-(+)-ácido lático com o propósito de reduzir os custos do processo industrial. Suas tentativas foram feitas para explorar dois resíduos agroindustriais: bagaço de mandioca e de cana, como

matérias-primas e suporte sólido inerte para a fermentação semi-sólida (SSF). O gelatinizado de bagaço de mandioca foi hidrolisado por enzimas e logo, o amido hidrolisado contendo açúcares redutores foi utilizado para umedecer o bagaço de cana inerte (utilizado como suporte sólido para a fermentação). O substrato foi suplementado com 0,5 gramas de NH_4Cl para cada 5 gramas de extrato de levedura. A fermentação foi realizada a 37°C por *Lactobacillus delbrueckii* como inóculo. Os parâmetros ótimos de umidade inicial e açúcar foram otimizados estatisticamente pela metodologia de delineamento central composto rotacional (DCCR). Foi obtido um rendimento máximo de ácido láctico de 249 mg por grama de substrato, após cinco dias de fermentação sob condições otimizadas e com uma eficiência de conversão de cerca de 99% dos açúcares reduzidos iniciais.

PLESSAS et al. (2007) avaliaram a produção de ácido láctico utilizando as cepas de *Kluyveromyces marxianus* (IFO 288), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (ATCC 11842) e *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009) individualmente ou em cultura mista em soro de queijo, em condições de fermentação estática e com agitação. As principais características avaliadas foram a biomassa seca, produção de ácido láctico e açúcar residual. Foi observado um aumento da produção de ácido láctico quando as culturas mistas foram utilizadas em comparação com as individuais.

JOHN et al. (2007) estudaram a otimização de cinco parâmetros do processo de fermentação com o objeto de tornar a produção de L-(+)-ácido láctico mais eficiente. Os parâmetros de estudo foram a concentração de bagaço de mandioca, enzima, extrato de levedura, NH_4Cl e inóculo. O estudo utilizou uma ferramenta estatística, um desenho Box-Behnken. O processo de fermentação foi conduzido em cultura mista de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus delbrueckii* por sacarificação e fermentação simultâneas. O rendimento máximo de ácido láctico de 81 gL^{-1} foi obtida nas condições de 15% (p/v) de bagaço de mandioca, 12,5 mL/L da mistura enzimática, $7,5 \text{ gL}^{-1}$ de extrato de levedura, 3 gL^{-1} de NH_4Cl e concentrado de inóculo com 3×10^{10} UFC/L da cultura mista de bacilos ácido lácticos, incubados por 60 horas a 37°C em cultura estática.

PETROV; URSHEV; PETROVA (2008) relataram a produção de ácido láctico por *Lactococcus lactis subsp. lactis B84*, utilizando amido como única fonte de carbono. Esta cepa fora isolado de centeio fermentado espontaneamente. Os componentes do meio de cultura e as condições de cultivo foram variados visando à máxima produtividade de ácido láctico. Em meio MRS-amido (com ausência de extratos de levedura e carne), a 33°C, agitação 200 rpm e pH 6,0 por seis dias, ocorreu a hidrólise total do amido e foram produzidos 5,5 gL⁻¹ de ácido láctico a partir de 18 gL⁻¹ de amido.

OHKOUCHI; INOUE (2008) descreveram vários fatores essenciais para a produção de ácido láctico mediante fermentação direta de restos de comida por *Lactobacillus manihotivorans LMG18011*. As melhores condições de sacarificação e fermentação simultâneas foram encontradas usando amido solúvel e resíduo de alimentos como substratos. Segundo OHKOUCHI; INOUE (2008) a produtividade pode ser afetada por três fatores: (1) pH inicial, que influencia a produção de amilase para sacarificação do amido, (2) o controle de pH da cultura que influencia na produção seletiva de L (+) ácido láctico, e (3) a concentração de manganês no meio, que influencia na taxa de produção e produtividade de ácido láctico. O pH inicial ótimo foi entre 5,0-5,5 e o pH eficaz na condição controlada para a fermentação directa e eficaz de substrato de amido foi de 5,0 com base no rendimento de L-(+)-ácido láctico. Sob essas condições a produção de ácido láctico foi de 19,5 g a partir de 200 g de restos de comida por *L. manihotivorans LMG18011*. Além disso, a adição de manganês estimulou a fermentação direta significativamente, e permitiu a bio-conversão completa dentro de um tempo de fermentação de 100 horas.

YU et al. (2008) utilizaram o DCCR na avaliação do efeito do uso da água de maceração de milho junto a glicose, melaço, Tween 80 e MnSO₄ na produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus CGMCC 1466*. A finalidade do uso da água de maceração de milho em cooperação a outros componentes foi substituir o extrato de levedura e diminuir os custos do processo. A análise estatística demonstrou que todas as variáveis tinham efeito significativo, definindo

como condições ótimas do meio para *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 na produção de ácido láctico as concentrações de glicose ($118,20 \text{ gL}^{-1}$), melaço ($37,27 \text{ mL/L}$), água de maceração de milho ($42,54 \text{ gL}^{-1}$), Tween 80 ($1,52 \text{ mL/L}$) e MnSO_4 ($0,30 \text{ gL}^{-1}$). A concentração máxima foi de $113,05 \text{ gL}^{-1}$ nestas condições ótimas, no tempo de 12h. A comparação do meio otimizado com água de maceração de milho com outro meio composto por extrato de levedura como única fonte de nitrogênio demonstrou um incremento de 30,4% na produção de ácido.

WEE; RYU (2009) na procura de matérias-primas mais econômicas para a produção de ácido láctico estudaram a fermentação contínua de hidrolisados lignocelulósicos e água de maceração de milho por *Lactobacillus spp. RKY2*. Foi demonstrado que as concentrações de ácido láctico diminuíram com o aumento da taxa de diluição dos substratos no meio, enquanto que a concentração residual de substrato aumentou. No entanto, a produção de ácido láctico foi mantida em mais de 0,90 gramas por cada grama de substrato em todos os casos experimentados. O sistema de cultivo com reciclo celular exerceu efeitos positivos sobre a eficiência da fermentação, incluindo produtividade volumétrica, que é atribuível à retenção das células no biorreator. O sistema de recirculação junto aos hidrolisados lignocelulósicos resultou em uma produtividade de ácido láctico de $6,7 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para uma taxa de diluição de $0,16 \text{ h}^{-1}$ usando 30 gL^{-1} de água de maceração de milho e $1,5 \text{ gL}^{-1}$ de extrato de levedura como nutrientes. A produtividade ($6,7 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) adquiridos pela fermentação contínua com reciclo foi 1,6 vezes maior que a produtividade de ácido láctico produzido na fermentação contínua, sem o sistema de reciclagem de células.

LIU et al. (2010) estudaram os efeitos de cinco alternativas de fontes nitrogenadas (broto de malte, água de maceração de milho (AMM), NH_4Cl , NH_4NO_3 e citrato diamina) sobre a produção de L-(+)- ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* As.1.3. Através da metodologia de planejamento fatorial fracionado e o delineamento composto central rotacional foram utilizadas na tentativa de encontrar a fonte de nitrogênio ideal e aperfeiçoar a média de custo-benefício. O broto de malte e AMM mostraram efeitos significativos na produção

de ácido láctico, e os seus valores ótimos no meio foram 16,0 gL⁻¹ e 12,0 gL⁻¹, respectivamente. Para a verificação do meio fez-se a comparação do meio de fermentação otimizado e o meio MRS, por estimativa dos parâmetros de taxa de crescimento celular, utilização de substrato e produção de ácido láctico. Demonstraram também que as cepas termófilas cultivadas em altas temperaturas têm as vantagens da auto seletividade, em processos não estéreis e alta produtividade.

KARP et al. (2011) utilizaram vinhaça de soja (principal subproduto em fermentação alcoólica de melaço de soja obtida do processo de destilação para a recuperação de etanol). A fermentação alcoólica de melaço de soja por *Saccharomyces cerevisiae* converte apenas 47% da quantidade total de carboidratos em etanol e CO₂. Os açúcares residuais são oligômeros, com ligações α -1,6. A vinhaça é então concentrada até 70-80° Brix e queimada em caldeira industrial. Algumas bactérias ácido-lácticas são capazes de consumir esses oligômeros pela ação da α -galactosidase, demonstrando assim a possibilidade de explorar a vinhaça de soja como substrato para a produção de ácido láctico.

CUI; LI; WAN (2011) estudaram uma cultura mista de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus brevis* para melhorar a utilização dos açúcares da celulose e hemicelulose derivada de palha de milho para a produção de ácido láctico. Durante sacarificação e fermentação simultâneas de híbridos de milho tratadas com hidróxido de sódio e pela mistura de culturas dos microrganismos, foi obtida uma produção de ácido láctico de 0,70 g/g, que foi cerca de 18,6% e 29,6% maior do que por uma única cultura de *L. rhamnosus* e *L. brevis*, respectivamente. Os resultados indicaram que a produção de ácido láctico a partir de palha de milho era comparável à de uma mistura de açúcares (0,73 gramas de glicose por cada grama de xilose na mistura na proporção 3:1 p/p).

Logo, existe a necessidade de reduzir o custo do meio de cultura, visando a possibilidade de aplicação industrial do ácido láctico. Sendo assim, resíduos agroindustriais como melaço de cana de açúcar e água de maceração de milho

podem ser utilizados como substratos alternativos para a produção desse composto. Este trabalho procurou dar enfoque a estes materiais como componentes de meios de cultura para produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo preliminar

3.1.1. Seleção da linhagem melhor produtora

Utilizou-se neste trabalho as bactérias *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797 obtidas junto à Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas - SP).

As cepas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura MRS previamente esterilizado a 121°C.

A composição do meio MRS é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Composição do meio de cultura sólido para bactérias

Componente	Concentração (gL ⁻¹)
Extrato de levedura	4,0
Extrato de carne	8,0
Peptona	10,0
Glicose	20,0
Mono Oleato de Sorbitan (Tween-80)	1,0
K ₂ HPO ₄	2,0
Na-acetato	2,0
(NH ₄) ₂ -citrato	2,0
MgSO ₄ .H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .H ₂ O	0,05

Fonte: Fundação André Tosello, 2011.

Lactobacillus delbrueckii spp. *bulgaricus* ATCC 11842 foi mantido na temperatura de 30°C e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797 foi mantido na temperatura de 37°C (Temperaturas de crescimento recomendadas pelo provedor). Incubadas em Incubadora B.O.D. (Marconi, mod. M 415/S) durante 24 horas. Cada frasco Erlenmeyer serviu como inóculo das fermentações nesta etapa preliminar.

As fermentações foram feitas em Incubadora B.O.D. (Marconi, mod. M 415/S). Utilizaram-se frascos Erlenmeyer de 150 ml contendo 100 ml de meio de fermentação (90 ml de meio MRS + 10 ml do inóculo). A fermentação foi mantida estática e o pH foi ajustado entre 6,2-6,5 no início com NaOH 5% p/v. O tempo de fermentação foi de 72 horas. As temperaturas de fermentação experimentadas para cada cepa de *Lactobacillus* foram 30, 37 e 45°C.

Ao término da fermentação foram avaliadas a produção de ácido láctico, biomassa seca, açúcares redutores e pH final.

3.2. Produção de ácido láctico

3.2.1. Preparo do inóculo

As cepas de *Lactobacillus* foram replicadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura Mann, Rogosa & Sharpe (MRS) previamente esterilizados a 121°C, mantidos na temperatura de 30°C por 24h. Estes tubos foram armazenados a -4°C. Cada tubo de ensaio serviu como pré-inóculo.

O inóculo foi preparado a partir do pré-inóculo, a cepa de *Lactobacillus* foi replicada em frascos Erlenmeyer contendo o meio de cultura MRS previamente esterilizado a 121°C, mantido na temperatura de 30°C por 24h.

3.2.2. Fermentação

Caldo MRS foi utilizado como meio para sementes, logo, o extrato de levedura e glicose foram substituídos por água de maceração de milho e melaço de cana respectivamente.

As fermentações foram feitas em Incubadora B.O.D. (Marconi, mod. M 415/S). Utilizaram-se frascos Erlenmeyer de 150 ml contendo 100 ml de meio de fermentação a ser estudado (90 ml de meio + 10 ml do inóculo).

A fermentação foi mantida estática e o pH foi ajustado entre 6,2-6,5 no início com NaOH 5% p/v.

3.2.3. Planejamento experimental

3.2.3.1. Delineamento Fatorial Fracionado 2^{5-1} .

Estas fermentações foram feitas em primeiro lugar de acordo com delineamento fatorial fracionado para 5 variáveis (2^{5-1} , acrescido de três repetições no ponto central) totalizando 19 ensaios, obtendo-se como resposta a produção de ácido láctico. A resposta foi avaliada no tempo de 72 horas. O objetivo foi determinar as variáveis estatisticamente significativas.

As variáveis independentes foram: concentração de melaço de cana, água de maceração de milho, peptona, extrato de carne e mono oleato de sorbitan (Tween-80). A fermentação foi mantida estática à temperatura de 37°C, o pH foi ajustado entre 6,2-6,5 no início com NaOH 5% p/v. Na Tabela 3 são mostrados os valores utilizados no desenho fatorial fracionado com seus níveis codificados e reais.

As concentrações de K_2HPO_4 , Na-acetato, $(NH_4)_2$ -citrato, $MgSO_4.H_2O$, $MnSO_4.H_2O$ do meio foram mantidas constantes como mostradas na Tabela 2.

Tabela 3: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no Delineamento fatorial fracionado 2^{5-1}

Níveis/Variáveis	-1	0	1
Melaço de cana (gL^{-1})*	10	20	30
Água de maceração de Milho (gL^{-1})**	2	4	6
Peptona (gL^{-1})	0	5	10
Extrato de carne (gL^{-1})	0	4	8
Mono oleato de sorbitan (gL^{-1})	0	0,5	1

* A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado era de 51%. ** A concentração de nitrogênio no lote de água de maceração de milho utilizado era de 50%.

3.2.3.2. Primeiro delineamento composto central rotacional (2^2).

Após o delineamento fatorial fracionado procedeu-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis (2^2 , acrescido de 4 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central) totalizando 12 ensaios, sendo o α igual a 1,41, obtendo-se como resposta a produção de ácido láctico. A resposta foi avaliada no tempo de 72 horas.

As variáveis independentes foram: concentração de melaço e de água de maceração de milho. A fermentação foi mantida estática à temperatura de 37°C e o pH foi ajustado entre 6,2-6,5 no início com NaOH 5% p/v. Na Tabela 4 são mostrados os valores utilizados no primeiro delineamento composto central rotacional com seus níveis codificados e reais.

Tabela 4: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro delineamento composto central rotacional (2^2)

Nível	-1,41	-1	0	1	1,41
Melaço de cana (g L^{-1})*	24	30	45	60	66
Água de maceração de Milho (g L^{-1})**	5	6	8	10	11

* A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado era de 51%. ** A concentração de nitrogênio no lote de água de maceração de milho utilizado era de 50%.

As concentrações de peptona, mono oleato de sorbitan, K_2HPO_4 , Na-acetato, $(\text{NH}_4)_2$ -citrato, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ do meio foram mantidas constantes como mostradas na Tabela 2.

O tempo de fermentação foi de 72 horas e amostras foram retiradas nos tempos de 24, 48 e 72 horas onde foram avaliadas a produção de ácido láctico, biomassa seca, açúcares redutores e pH final.

3.2.3.3. Segundo delineamento composto central rotacional (2^3).

O análise do primeiro DCCR gerou um novo estudo, ou seja um segundo delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis (2^3 , acrescido de 6 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central) totalizando 18 ensaios, sendo o α igual a 1,68, obtendo-se como resposta a produção de ácido láctico. A resposta foi avaliada no tempo de 96 horas.

As variáveis independentes foram: concentração de melaço, peptona e de água de maceração de milho. A fermentação foi mantida estática à temperatura de 37°C e o pH foi ajustado entre 6,2-6,5 no início com NaOH 5% p/v. A Tabela 5

mostra os valores utilizados no segundo delineamento composto central rotacional com seus níveis codificados e reais.

Tabela 5: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo delineamento composto central rotacional (2^3)

Nível	-1,68	-1	0	1	1,68
Melaço de cana (gL^{-1})*	40	60	90	120	140
Água de maceração de Milho (gL^{-1})**	3	6	10	14	17
Peptona (gL^{-1})	5	6	8	10	11

* A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado era de 51%. ** A concentração de nitrogênio no lote de água de maceração de milho utilizado era de 50%.

As concentrações de mono oleato de sorbitan, K_2HPO_4 , Na-acetato, $(\text{NH}_4)_2$ -citrato, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ do meio foram mantidas constantes como mostradas na Tabela 2.

O tempo de fermentação foi de 96 horas e amostras foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas onde foram avaliadas a produção de ácido láctico, biomassa seca, açúcares redutores e pH final.

3.2.3.4. Terceiro delineamento composto central rotacional (2^2).

Depois da análise do segundo delineamento composto central rotacional (DCCR) procedeu-se ao terceiro e último delineamento, para duas variáveis (2^2 , acrescido de 4 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central) totalizando 12 ensaios, sendo o α igual a 1,41, obtendo-se como resposta a produção de ácido láctico. A resposta foi avaliada no tempo de 96 horas.

As variáveis independentes foram: concentração de melaço e concentração de água de maceração de milho. A fermentação foi mantida estática à temperatura de 37°C e o pH foi ajustado entre 6,2-6,5 no início com NaOH 5% p/v. Na Tabela 6 são mostrados os valores utilizados no primeiro delineamento composto central rotacional com seus níveis codificados e reais.

Tabela 6: Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no terceiro delineamento composto central rotacional (2^2)

Nível	-1,41	-1	0	1	1,41
Melaço de cana (g L^{-1})*	95	120	180	240	265
Água de maceração de Milho (g L^{-1})**	4	6	10	14	16

* A concentração de açúcares redutores totais no lote de melaço utilizado era de 51%. ** A concentração de Nitrogênio no lote de água de maceração de milho utilizado era de 50%.

As concentrações de mono oleato de sorbitan, K_2HPO_4 , Na-acetato, $(\text{NH}_4)_2$ -citrato, $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ do meio foram mantidas constantes como mostradas na Tabela 2.

O tempo de fermentação foi de 96 horas e amostras foram retiradas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas onde foram avaliadas a produção de ácido láctico, biomassa seca, açúcares redutores e pH final.

3.3. Metodologia analítica

3.3.1. Determinação do ácido láctico

O ácido láctico foi determinado pela metodologia proposta por LAWRENCE (1975) que se baseia na conversão do lactato para acetaldeído pelo ácido sulfúrico concentrado em presença de sulfato de cobre. A concentração de ácido

lático é calculada pelo conteúdo de acetaldeído, o qual é determinado colorimetricamente usando-se p-hidroxidifenil. A determinação da concentração de ácido láctico foi feita através de comparação com curva padrão de ácido láctico. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS da marca HACH, modelo DR-4000 no comprimento de onda de 570nm.

3.3.2. Determinação da biomassa seca

Amostras de 10 ml do meio contendo uma massa celular em fase aquosa foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15min, em centrífuga EXCELSA BABY II modelo 206-R, obtendo-se duas fases; a massa celular decantada e a fase aquosa livre de células. O sobrenadante foi retirado do tubo e reservado para demais análises. A massa celular precipitada foi lavada uma vez com água destilada e novamente precipitada por centrifugação, sendo seca a 65°C até peso constante em estufa a vácuo SUPRILAB, modelo GST-920. Os resultados finais foram expressos em gL⁻¹ de meio.

3.3.3. Determinação de açúcares redutores totais (ART)

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método colorimétrico adaptado de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1926 e NELSON, 1944).

Como o substrato foi melaço de cana, foi previamente realizada uma inversão dos açúcares. No caso, foi realizada hidrólise ácida com 1ml da amostra e 1ml de HCl 2N colocando-se em banho-maria a 100°C por 6min, seguida de neutralização com 1 ml de NaOH 2N. Logo o açúcar reduzido calculado foi interpretado como sacarose.

A determinação de ART das amostras foi feita através da comparação com curva padrão de sacarose. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS da marca HACH, modelo DR-4000 no comprimento de onda de 540 nm.

3.3.4. Determinação do pH

O pH de cada amostra foi medido através de potenciômetro digital, marca DIGIMED, modelo DM20.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Ensaio preliminares: análise dos microrganismos produtores e curvas de produção de ácido láctico e biomassa seca, consumo de sacarose e pH

Os resultados dos testes preliminares de produção de ácido láctico, concentração de sacarose residual, produção de biomassa e pH finais são mostrados a seguir, os resultados se mostram nas Figuras (3), (4), (5) e (6):

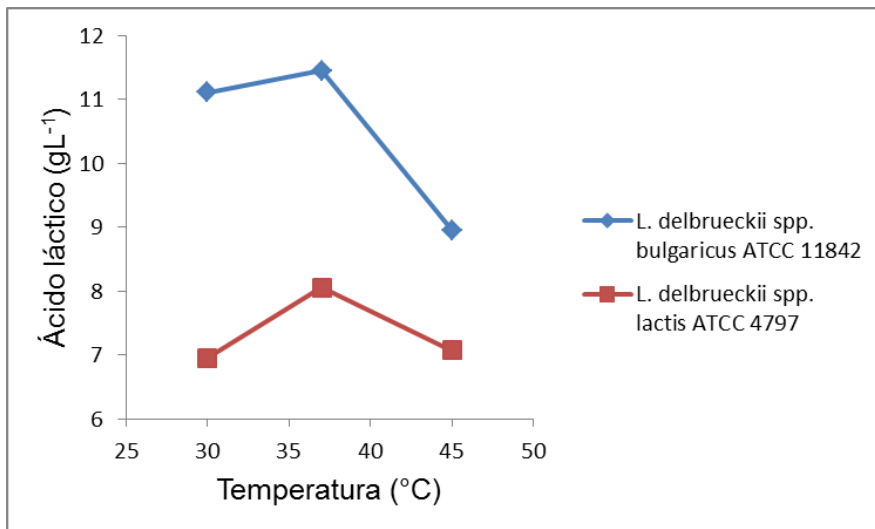


Figura 3: Produção de ácido láctico durante processo fermentativo para as linhagens de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797 após 72 horas.

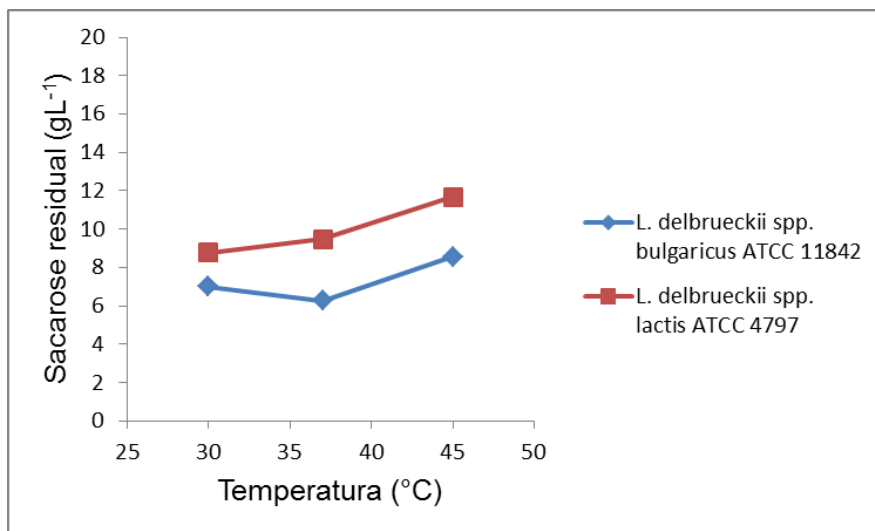


Figura 4: Concentração de sacarose residual após 72 horas da produção de ácido láctico durante processo fermentativo para as linhagens de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797.

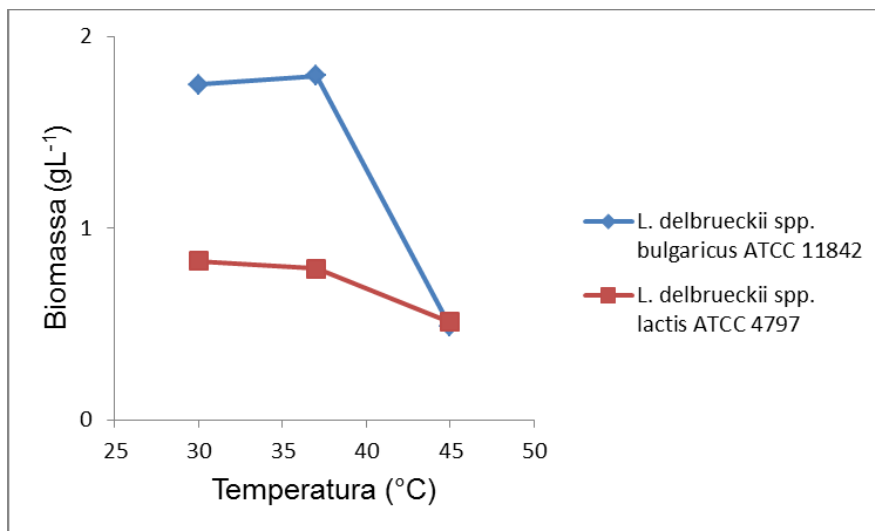


Figura 5: Concentração de biomassa celular após 72 horas da produção de ácido láctico durante processo fermentativo para as linhagens de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797.

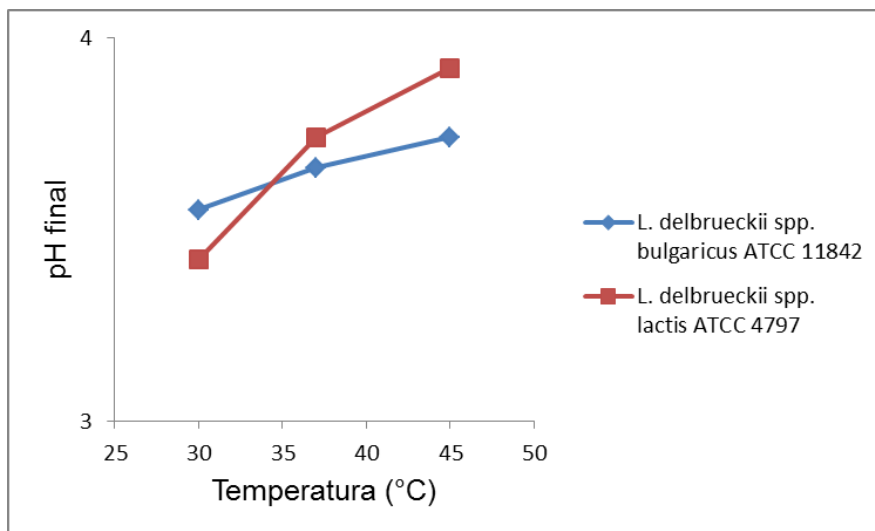


Figura 6: Valor de pH do meio de cultivo após 72 horas da produção de ácido láctico para as linhagens de bactérias ácido lácticas *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797.

As Figuras correspondem à fermentação de duas linhagens de bactérias ácido lácticas da glicose contida no meio MRS., *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797. O pH inicial do meio de cultura foi de 6,6 e as amostras foram coletadas após 72 horas de fermentação. O objetivo foi determinar a linhagem mais eficiente para produção de ácido láctico e a temperatura adequada de fermentação.

Na Figura 3, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 mostrou major produção de ácido láctico (gL^{-1}) para todas as temperaturas de fermentação testadas, quando comparado com *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797.

Na Figura 4, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 mostrou menor concentração de sacarose residual (gL^{-1}) para todas as temperaturas de fermentação testadas, quando comparado com *L. delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797.

Sendo a concentração inicial de substrato de 20 gL^{-1} na formulação padrão, a produção de ácido láctico foi mantida em valor médio de 0,82 e 0,74 gramas de

ácido láctico por cada grama de glicose fermentada por *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797, respectivamente.

Na Figura 5, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 mostrou maior concentração de biomassa seca (gL^{-1}) após a produção de ácido láctico para todas as temperaturas de fermentação testada. Esta concentração de biomassa seca após 72 horas quando comparada com a relação gramas de ácido láctico produzido por cada grama de substrato consumido, mostrou que *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 requer uma menor quantidade de substrato para cobrir suas necessidades de crescimento, o que também se apresenta com maior rapidez quando comparado com *L. delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797,

Na Figura 6, o valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico mostrou que as duas linhagens estudadas mantêm a produção de ácido láctico em pH menores que o valor de pH ótimo teórico. Este análise deu respaldo a decisão de não considerar o pH como um parâmetro do estudo da otimização deste meio de cultura.

A linhagem *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 apresentou concentração de biomassa seca, consumo do substrato e produção de ácido láctico mais elevadas a temperatura de 37°C , chegando à concentração máxima de $11,44 \text{ gL}^{-1}$ de ácido láctico e $1,80 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa. Nesta temperatura, a concentração de sacarose residual foi também mínima ($6,30 \text{ gL}^{-1}$).

A linhagem *L. delbrueckii* spp. *lactis* ATCC 4797 apresentou concentração de biomassa seca, consumo do substrato e produção de ácido láctico menores quando comparada a *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC11842, a concentração máxima de ácido láctico foi de $8,05 \text{ gL}^{-1}$ e $0,80 \text{ gL}^{-1}$ de biomassa. A concentração de sacarose residual mínima foi de $8,76 \text{ gL}^{-1}$, em temperaturas entre $30\text{-}37^{\circ}\text{C}$.

4.1.1. Seleção da linhagem melhor produtora

Dentre as linhagens avaliadas, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 foi escolhida para o estudo da produção do ácido láctico, pois

apresentou taxas de produção de ácido láctico e biomassa seca mais elevadas. Das provas preliminares estabelece-se também que a temperatura de fermentação para a produção de ácido láctico será de 37°C.

4.2. Planejamento fracionado 2⁵⁻¹ usando melaço de cana como fonte de carbono

4.2.1. Resultados dos ensaios

O primeiro delineamento experimental levado a cabo foi um delineamento fatorial fracionado com o objetivo de determinar as variáveis estatisticamente significativas.

Neste delineamento as faixas de estudo para a concentração de melaço de cana e da água de maceração de milho foram definidas entre 10 - 30 gL⁻¹ e entre 6 - 10 gL⁻¹, respectivamente. As concentrações definiram-se assim substituindo as concentrações mássicas da glicose e extrato de levedura originais no meio MRS.

As faixas de estudo para as variáveis concentração de peptona, extrato de carne e mono oleato de sorbitan foram definidas desde a ausência destes componentes (nível inferior) até a concentração original no meio padrão (nível superior).

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas e respostas de produção de ácido láctico, esta apresentada na Tabela 7.

Tabela 7: Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} (contendo valores reais e codificados) com as respostas de ácido láctico (gL^{-1}) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Ensaio	X_1^a	X_2^b	X_3^c	X_4^d	X_5^e	A.L. ^f
1	-1 (10)	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	4,69
2	1 (30)	-1 (2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	6,04
3	-1 (10)	1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	3,55
4	1 (30)	1 (6)	-1 (0)	-1 (0)	1 (1)	6,73
5	-1 (10)	-1 (2)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	5,38
6	1 (30)	-1 (2)	1 (10)	-1 (0)	1 (1)	7,28
7	-1 (10)	1 (6)	1 (10)	-1 (0)	1 (1)	5,08
8	1 (30)	1 (6)	1 (10)	-1 (0)	-1 (0)	7,02
9	-1 (10)	-1 (2)	-1 (0)	1 (8)	-1 (0)	4,84
10	1 (30)	-1 (2)	-1 (0)	1 (8)	1 (1)	6,58
11	-1 (10)	1 (6)	-1 (0)	1 (8)	1 (1)	5,32
12	1 (30)	1 (6)	-1 (0)	1 (8)	-1 (0)	5,82
13	-1 (10)	-1 (2)	1 (10)	1 (8)	1 (1)	4,04
14	1 (30)	-1 (2)	1 (10)	1 (8)	-1 (0)	6,23
15	-1 (10)	1 (6)	1 (10)	1 (8)	-1 (0)	6,20
16	1 (30)	1 (6)	1 (10)	1 (8)	1 (1)	7,24
17	0 (20)	0 (4)	0 (5)	0 (4)	0 (0,5)	6,30
18	0 (20)	0 (4)	0 (5)	0 (4)	0 (0,5)	6,07
19	0 (20)	0 (4)	0 (5)	0 (4)	0 (0,5)	6,35

^a Concentração de melaço de cana (gL^{-1}) - 51% de ART para o lote utilizado; ^b concentração de água de maceração de milho (gL^{-1}) - 50% de nitrogênio para o lote utilizado; ^c concentração de peptona (gL^{-1}); ^d concentração de extrato de carne (gL^{-1}); ^e concentração de mono oleato de sorbitan (Tween-80) (gL^{-1}) e ^f ácido láctico (gL^{-1}).

O menor valor observado entre as respostas do planejamento foi de 3,55 gL⁻¹ de ácido láctico, para o ensaio 3, e os maiores valores foram de 7,28 e 7,24 gL⁻¹, para os ensaios 6 e 16, respectivamente. É interessante notar que a condição onde obteve-se menor produção de ácido láctico não continha peptona, extrato de carne nem mono oleato de sorbitan. Por outro lado, um dos ensaios com maior produção também não continha extrato de carne no meio de cultivo.

4.2.2. Análise estatística

Analisando-se os resultados da Tabela 7 foi possível calcular os efeitos das cinco variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Efeito dos fatores estudados no planejamento fracionado 2⁵⁻¹ para produção de ácido láctico (gL⁻¹) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Fatores	Efeito ^f	Erro Padrão	t (2)	p-valor
Média	5,8295	0,0343	170,1585	<0,0001*
X ₁ ^a	1,7300	0,0747	23,1699	0,0019*
X ₂ ^b	0,2350	0,0747	3,1474	0,0879*
X ₃ ^c	0,6125	0,0747	8,2032	0,0145*
X ₄ ^d	0,0625	0,0747	0,8371	0,4906
X ₅ ^e	0,2350	0,0747	3,1474	0,0879*

^a Concentração de melaço de cana (gL⁻¹) - 51% de ART para o lote utilizado; ^b concentração de água de maceração de milho (gL⁻¹) - 51% de nitrogênio para o lote utilizado; ^c concentração de peptona (gL⁻¹); ^d concentração de extrato de carne (gL⁻¹); ^e concentração de mono oleato de sorbitan (Tween-80) (gL⁻¹) e ^f efeitos apresentados em gL⁻¹. * p ≤ 0,10

Pode-se verificar na Tabela 8 que, com exceção do extrato de carne, todas as demais variáveis apresentaram efeitos sobre a resposta ao nível de significância de 90% ($p \leq 0,10$). As variáveis apresentaram efeito positivo sobre a resposta, indicando que maiores valores de produção de ácido láctico ocorreram em ensaios contendo maiores concentrações destes componentes.

Note-se na Tabela 8 que, das cinco variáveis estudadas, a concentração de melaço de cana e peptona são aquelas que apresentam os menores p – valores, podendo-se considerar neste delineamento como efeitos principais. Ao observar as melhores respostas da produção de ácido láctico, isto acontece nos ensaios 6 e 16, em ambos ensaios as concentrações de melaço de cana e peptona se encontraram no nível superior (Tabela 7) .

O delineamento fatorial fracionado forneceu informações importantes para o ajuste das variáveis e direcionamento dos estudos. Sendo assim, para a realização do primeiro planejamento completo, visando a otimização da produção de ácido láctico, e o uso de substratos mais econômicos, a faixa de estudo para a concentração de melaço de cana foi redefinida entre 30 - 60 gL^{-1} , o que corresponde aproximadamente a 15 - 30 gL^{-1} de ART; a faixa de estudo da concentração de água de maceração de milho se redefinida também entre 6 - 10 gL^{-1} .

Como as variáveis concentração de peptona e mono oleato de sorbitan apresentaram efeito positivo, decidiu-se por mantê-las nas concentrações de 10 e 1,0 gL^{-1} , respectivamente. Ou seja, nas concentrações iguais aquelas encontradas no meio MRS. O incremento desses compostos no meio de cultivo não foi sugerido, pois ocasionaria um aumento indesejável nos custos de produção do ácido láctico.

A variável concentração de extrato de carne não apresentou efeito significativo ao nível de significância de 90%, por isso tomou-se a decisão de retirá-la da formulação do meio de cultura, pois não interfere no processo fermentativo.

4.3. Primeiro delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de ácido láctico

Em função das considerações expostas no item 4.2, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado para a otimização da produção de ácido láctico, considerando como variáveis as concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho.

4.3.1. Resultados dos ensaios

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a produção de ácido láctico estão apresentadas na Tabela 9. O tempo de fermentação foi de 72 horas.

As melhores respostas para a produção de ácido láctico se apresentaram nos ensaios 2 e 6, com 11,71 e 11,50 gL⁻¹, sendo a variação da concentração de melaço de cana entre 60 – 66 gL⁻¹, e água de maceração de milho entre 6 – 8 gL⁻¹.

As menores respostas para a produção de ácido láctico se apresentaram nos ensaios 1 e 5, com 7,46 e 7,58 gL⁻¹. Sendo, concentração de melaço de cana entre 24 – 30 gL⁻¹, e água de maceração de milho entre 6 – 8 gL⁻¹.

Análise simples da Tabela 9 pode-nos sugerir que a produção de ácido láctico é sendo proporcional à variável de concentração de melaço de cana, sendo que, maior e menor produção de ácido láctico produz-se na mesma faixa de concentração de água de maceração de milho.

Tabela 9: Matriz do primeiro DCCR contendo valores reais e codificados das variáveis, resposta sobre a produção de ácido láctico (gL^{-1}), valores preditos pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	X_1^a	X_2^b	A.L. ^c	A.L. predita ^d	Desvio Relativo ^e
1	-1 (30)	-1 (6)	7,46	7,27	2,56
2	1 (60)	-1 (6)	11,71	11,28	3,63
3	-1 (30)	1 (10)	8,50	8,91	-4,77
4	1 (60)	1 (10)	10,73	10,90	-1,60
5	-1,4142 (24)	0 (8)	7,58	7,15	5,68
6	1,4142 (66)	0 (8)	11,50	11,40	0,87
7	0 (45)	-1,4142 (5)	9,03	9,46	-4,78
8	0 (45)	1,4142 (11)	10,76	10,35	3,83
9	0 (45)	0 (8)	9,03	9,28	-2,71
10	0 (45)	0 (8)	9,36	9,28	0,91
11	0 (45)	0 (8)	8,75	9,28	-6,00
12	0 (45)	0 (8)	9,41	9,28	1,43

^a concentração de melaço decano (gL^{-1}); ^b concentração de água de maceração de milho (gL^{-1}); ^c ácido láctico (gL^{-1}); ^d valores de ácido láctico predito pelo modelo (gL^{-1}); ^e desvio relativo= $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

4.3.2. Análise estatística

A análise dos coeficientes de regressão das variáveis foi realizada utilizando o teste t de Student para determinar a significância estatística dos mesmos. Para o Delineamento Composto Central Rotacional foram analisados os fatores lineares e quadráticos para cada variável, assim como a interação entre eles ($X_1 \times X_2$). A análise foi realizada para amostras coletadas após 72 horas de fermentação, mostrado na Tabela 10.

Tabela 10: Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido láctico (gL⁻¹) por *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* ATCC 11842.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Media	9,1375	0,2174	42,0246	<0,0001*
X ₁ (L)	1,5030	0,1537	9,7755	<0,0001*
X ₁ (Q)	0,1719	0,1719	0,9999	0,3560
X ₂ (L)	0,3133	0,1537	2,0379	0,0877*
X ₂ (Q)	0,3494	0,1719	2,0325	0,0884*
X ₁ xX ₂	-0,5050	0,2174	-2,3226	0,0592*

*p≤0,10; L- termos lineares; Q- termos quadráticos; X₁ - concentração de melaço de cana (gL⁻¹); X₂ – concentração de água de maceração de milho (gL⁻¹).

Considerando-se significativos os parâmetros com p – valores menores que 10% (p ≤ 0,1) mostrados na Tabela 10 obteve-se a Equação 4.1, que representa o modelo quadrático com as variáveis codificadas da produção de ácido láctico em função das variáveis estudadas para *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* ATCC 11842. Assim, o termo quadrático da concentração de melaço de cana não foi significativo, eliminando-se do modelo e adicionando-se aos resíduos.

$$\text{Ácido láctico (gL}^{-1}\text{)} = 9,2750 + 1,5030.X_1 + 0,3133X_2 + 0,3150X_2^2 - 0,5050X_1X_2$$

[4.1]

A Figura 7 mostra os valores preditos pelo modelo contra os valores experimentais para melhor visualização da adequação do modelo.

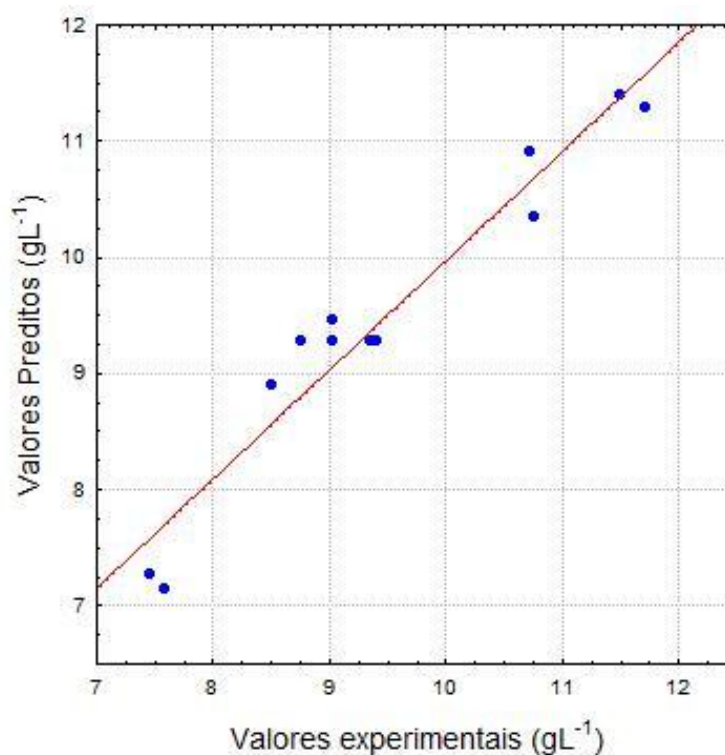


Figura 7: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais

É possível observar que o modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes, pois os pontos se situam próximos à reta de coeficiente angular 1 (Figura 7).

A análise de variância (ANOVA) para a produção de ácido láctico, considerando somente termos estatisticamente significativos, esta apresentada na Tabela 11.

Como o F calculado para a regressão foi altamente significativo ($p=0,0002$), sendo 9,17 vezes maior que o F tabelado, e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 94\%$), podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta.

Os desvios relativos (Tabela 9) foram inferiores a 6%, comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

Tabela 11: ANOVA do modelo quadrático para predição da produção de ácido láctico (g L^{-1}) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Fonte de Variação	S.Q. ^a	G.L. ^b	Q.M. ^c	F calculado	p-valor
Regressão	20,5382	4,0	5,1346	27,1524	0,0002
Resíduos	1,3237	7,0	0,1891		
Total	21,8619	11,0			

% variação explicada (R^2) = 93,945 $F_{4;7;0,10} = 2,96$

^a soma dos quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios.

Pode-se observar, através da análise da superfície de resposta (Figura 8) e curvas de contorno (Figura 9), que há uma região ótima para a maior produção de ácido láctico dentro da faixa estudada. A melhor faixa de concentração de melaço de cana foi entre 55,5 – 66,6 g L^{-1} , o que corresponde a 28 – 34 g L^{-1} de ART. Já para água de maceração de milho a melhor faixa de estudo foi entre 6 - 8 g L^{-1} .

De acordo com RODRIGUES; LEMMA (2005), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda, o processo na condição otimizada.

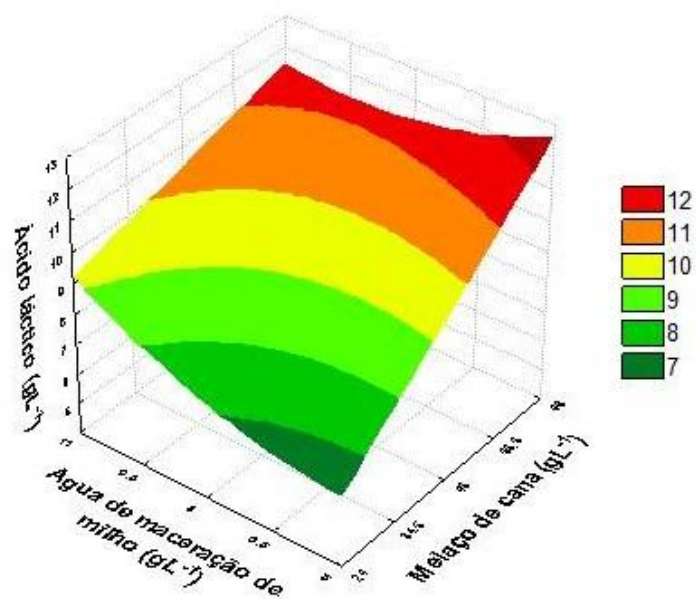


Figura 8: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

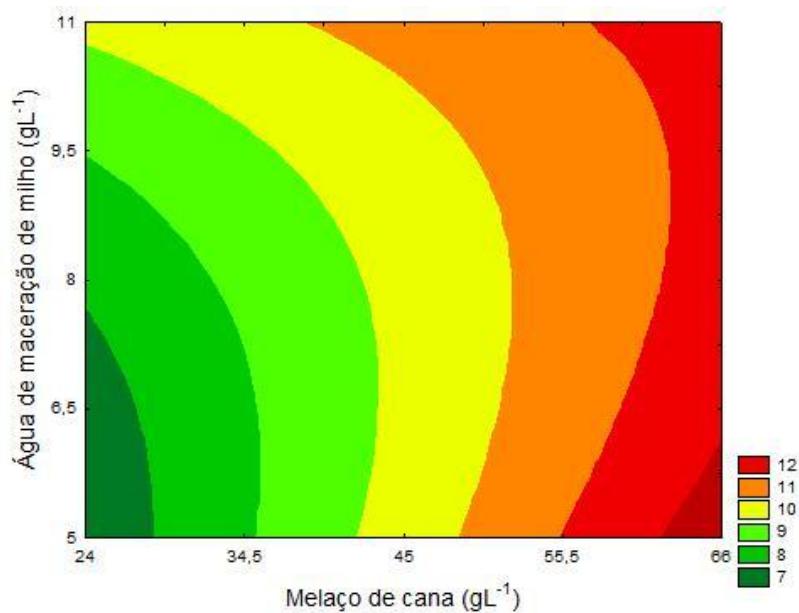


Figura 9: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Observa-se que a produção de ácido láctico poderia ser ainda maior se houvesse um incremento da concentração de melaço de cana. Por isso foi proposta a realização de um segundo planejamento experimental, para estudarmos concentrações maiores de melaço de cana e água de maceração de milho. A concentração de peptona também foi adicionada ao planejamento experimental na tentativa de se reduzir seu conteúdo na formulação.

4.3.3. Determinações analíticas

O primeiro DCCR foi acompanhado da análise das amostras coletadas após 24, 48 e 72 horas de fermentação, mostrado nas Figuras (10), (11), (12) e (13).

Neste primeiro planejamento a relação grama de ácido láctico por cada grama substrato foi de 0,68. A relação foi calculada com os dados obtidos das determinações analíticas de ácido láctico e açúcares redutores totais.

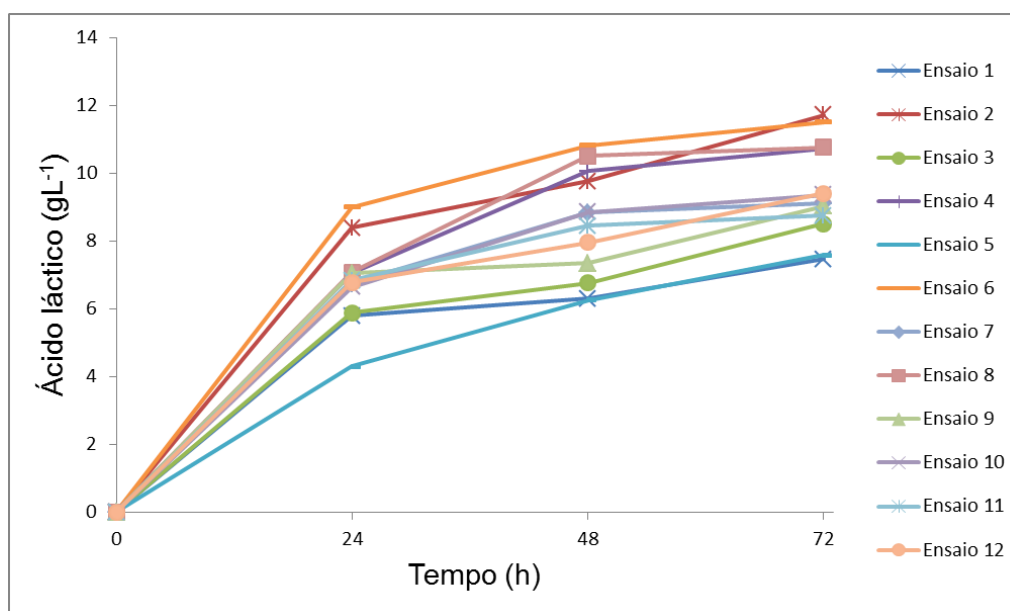


Figura 10: Produção de ácido láctico durante o processo fermentativo para os ensaios do primeiro DCCR (2²)

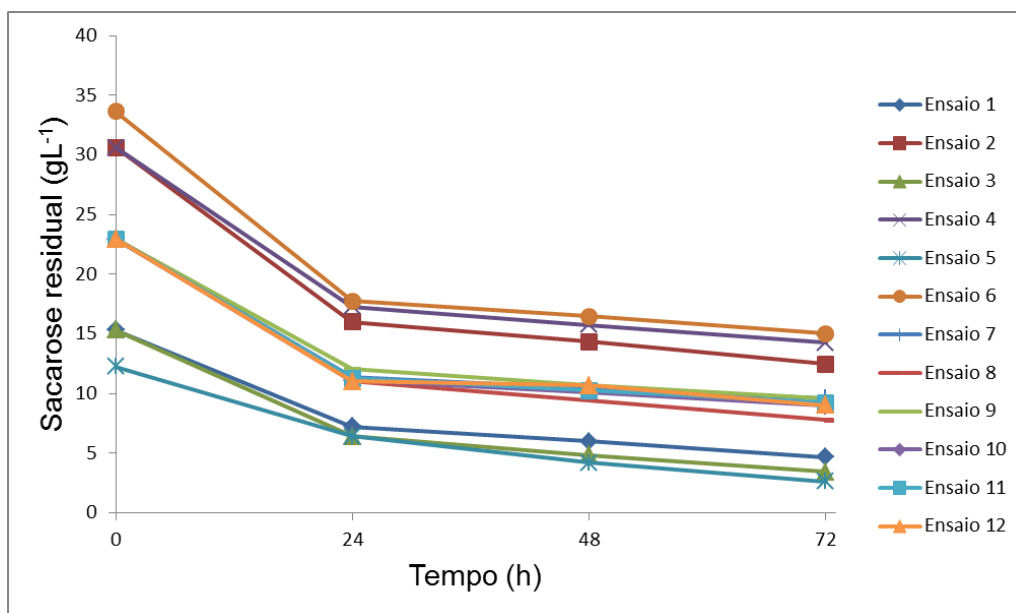


Figura 11: Concentração de sacarose residual após a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo dos ensaios do primeiro DCCR (2²)

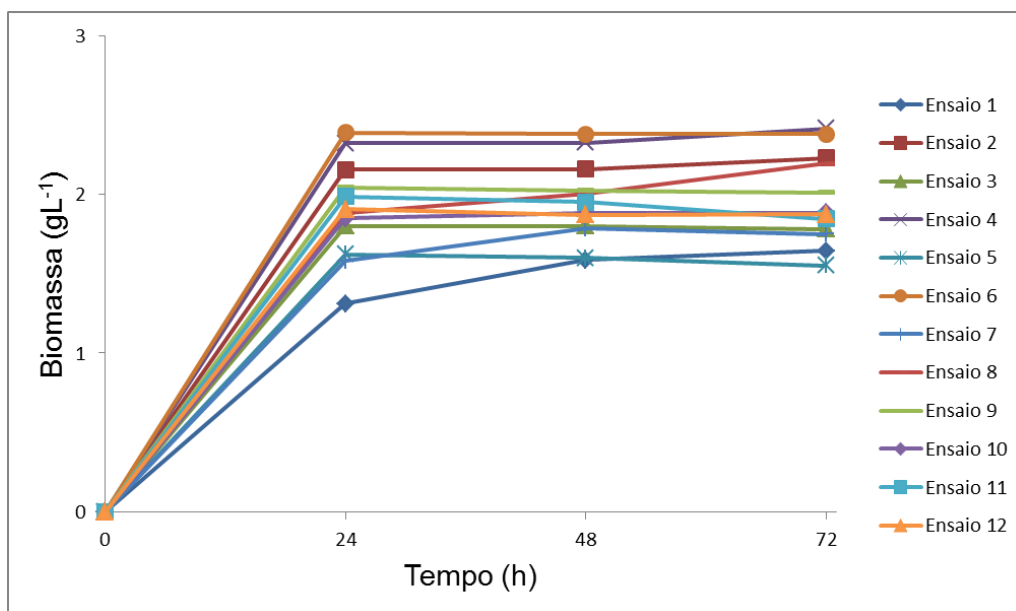


Figura 12: Concentração de biomassa seca após a produção de ácido láctico durante processo fermentativo dos ensaios do primeiro DCCR (2²)

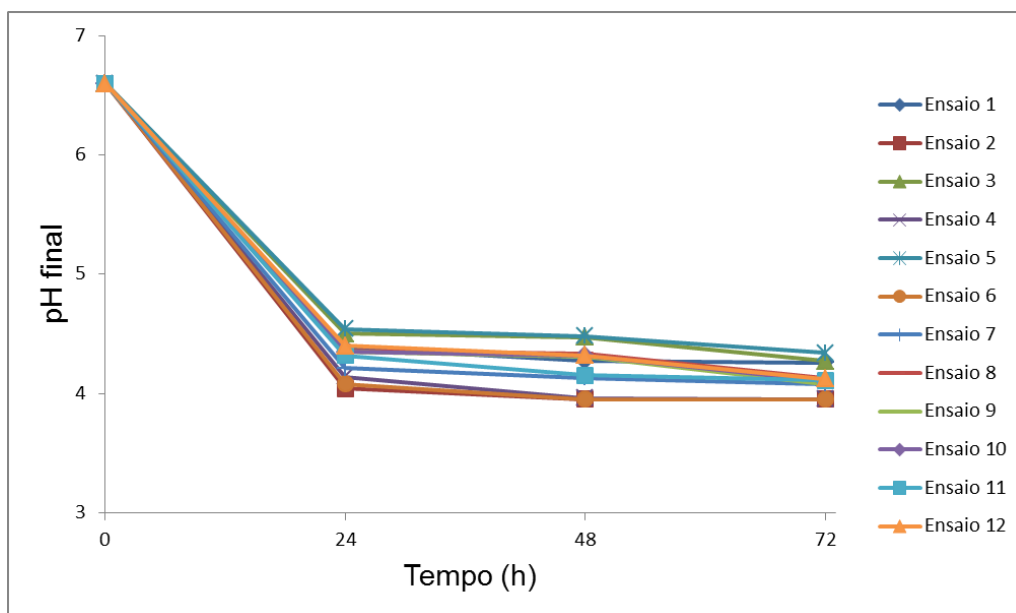


Figura 13: Valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico nos ensaios do primeiro DCCR (2^2)

A Figura 11 mostra como nas diferentes concentrações iniciais do substrato na formulação de cada ensaio, a produção de ácido láctico nas primeiras 24 horas foi mantida entorno de 0,59 gramas de ácido láctico por cada grama de substrato fermentada por *L. delbrueckii spp. bulgaricus ATCC 11842*. Logo, nas horas seguintes de 48 e 72 horas a produção foi mantida entorno de 0,79 gramas de ácido láctico por cada grama de substrato fermentada.

A taxa de produção de ácido láctico foi maior nas primeiras 24 horas (Figura 10), neste tempo o consumo de substrato foi também maior em todos os testes (Figura 11), embora a relação gramas de produto por grama de substrato consumido tenha sido menor. Isto indica que nas primeiras 24 horas o microrganismo se multiplica com rapidez (Figura 12), parte do substrato passa a integrar as novas células, logo, nas horas seguintes o microrganismo não se multiplica com rapidez, mas continua requerendo substrato para sua manutenção.

YUN; WEE; RYU (2003) obteve um rendimento na produção de ácido láctico de 0,96 gramas por grama de fonte de carbono quando fermentaram glicose, frutose e maltose por *Enterococcus faecalis* RKY1. Nos ensaios preliminares *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 apresentou um rendimento na produção de ácido láctico de 0,82 gramas por grama de fonte de carbono, quando fermentaram glicose. YUN; WEE; RYU (2003) também testara outras fontes de carbono como galactose obtendo ácidos fórmico e acético como produtos principais desta fermentação, enquanto que o glicerol, xilose, soro de leite e amido foram pobremente fermentados produzindo ácido láctico por *Enterococcus faecalis* RKY1. Logo, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 mostrou-se ser boa escolha na fermentação de subprodutos da agroindústria.

A Figura 12 mostra a concentração de biomassa seca que estão entre 1,5 gL⁻¹ (ensaio 1 e 5) até 2,5 gL⁻¹ (ensaio 6). A menor concentração de biomassa seca final corresponde à menor resposta da produção de ácido láctico, e a maior concentração de biomassa seca à com maior concentração de ácido láctico. A produção de ácido láctico mostrou-se relacionada ao crescimento do microrganismo.

A Figura 13 mostra os valores de pH. O menor valor de pH nas 72 horas de fermentação foi de 3,95 para os ensaios 2, 4 e 6, que correspondem ao nível superior de concentração de melaço de cana e a maior produção de ácido láctico gerada. O pH baixo não prejudicou a fermentação de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

4.4. Segundo delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de ácido láctico

Em função das considerações expostas no item 4.3, um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado para a otimização da produção

de ácido láctico considerando como variáveis as concentrações de melaço de cana, água de maceração de milho e concentração de peptona.

4.4.1. Resultados dos ensaios

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a produção de ácido láctico estão apresentadas na Tabela 12. O tempo de fermentação foi de 96 horas.

As melhores respostas para a produção de ácido láctico neste segundo DCCR ocorreram nos ensaios 8 e 10, com 16,4 e 15,89 gL⁻¹. Sendo, concentração de melaço de cana entre 120 – 140 gL⁻¹, água de maceração de milho entre 10 – 14 gL⁻¹ e peptona entre 8 – 10 gL⁻¹.

As menores respostas para a produção de ácido láctico ocorreram nos ensaios 1 e 9, com 7,09 e 8,16 gL⁻¹, quando a concentração de melaço de cana estava entre 40 – 60 gL⁻¹, água de maceração de milho entre 6 – 10 gL⁻¹ e peptona entre 6 – 8 gL⁻¹.

Para variável melaço de cana, a melhor produção ocorreu na máxima concentração e a menor produção de ácido láctico ocorreu na mínima concentração. Novamente, a produção de ácido láctico foi proporcional à concentração de melaço de cana no meio.

Tabela 12: Matriz do segundo DCCR contendo valores reais e codificados das variáveis, resposta sobre a produção de ácido láctico (gL^{-1}), valores preditos pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	X_1^a	X_2^b	X_3^c	A.L. ^d	A.L. pred. ^e	Desvio Rel. ^f
1	-1 (60)	-1 (6)	-1 (6)	8,16	9,49	-16,32
2	1 (120)	-1 (6)	-1 (6)	15,35	15,42	-0,42
3	-1 (60)	1 (14)	-1 (6)	10,66	9,49	10,96
4	1 (120)	1 (14)	-1 (6)	15,54	15,42	0,80
5	-1 (60)	-1 (6)	1 (10)	8,46	9,49	-12,19
6	1 (120)	-1 (6)	1 (10)	15,52	15,42	0,68
7	-1 (60)	1 (14)	1 (10)	9,88	9,49	3,93
8	1 (120)	1 (14)	1 (10)	16,40	15,42	6,00
9	-1,6818 (40)	0 (10)	0 (8)	7,09	7,47	-5,39
10	1,6818 (140)	0 (10)	0 (8)	15,89	17,43	-9,72
11	0 (90)	-1,6818 (3)	0 (8)	12,58	12,45	1,01
12	0 (90)	1,6818 (17)	0 (8)	11,94	12,45	-4,30
13	0 (90)	0 (10)	-1,6818 (5)	12,85	12,45	3,09
14	0 (90)	0 (10)	1,6818 (11)	12,58	12,45	1,01
15	0 (90)	0 (10)	0 (8)	13,24	12,45	5,94
16	0 (90)	0 (10)	0 (8)	11,88	12,45	-4,83
17	0 (90)	0 (10)	0 (8)	12,79	12,45	2,63
18	0 (90)	0 (10)	0 (8)	13,35	12,45	6,72

^a concentração de melaço de cana (gL^{-1}); ^b concentração de água de maceração de milho (gL^{-1}); ^c concentração de peptona (gL^{-1}); ^d ácido láctico (gL^{-1}); ^e valores de ácido láctico predito pelo modelo (gL^{-1}); ^f desvio relativo= $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

4.4.2. Análise estatística

A análise dos coeficientes de regressão das variáveis foi realizada utilizando o teste t de Student para determinar a significância estatística dos mesmos. Para o segundo delineamento composto central rotacional, foram analisados os fatores lineares e quadráticos para cada variável, bem como a interação entre eles ($X_1 \times X_2$; $X_1 \times X_3$ e $X_2 \times X_3$) (Tabela 13). A análise foi realizada para amostras coletadas após 96 horas de fermentação.

Tabela 13: Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido láctico (g L^{-1}) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(8)	p-valor
Media	12,79655	0,418461	30,58003	<0,0001*
X_1 (L)	2,96187	0,226803	13,05923	<0,0001*
X_1 (Q)	-0,38590	0,235664	-1,63751	0,140158
X_2 (L)	0,28657	0,226803	1,26352	0,241976
X_2 (Q)	-0,11367	0,235664	-0,48232	0,642496
X_3 (L)	0,00702	0,226803	0,03097	0,976055
X_3 (Q)	0,04720	0,235664	0,20029	0,846253
$X_1 \times X_2$	-0,35625	0,296332	-1,20220	0,263660
$X_1 \times X_2$	0,1885	0,296332	0,63695	0,541948
$X_1 \times X_2$	-0,04875	0,296332	-0,16451	0,873409

* $p \leq 0,10$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos; X_1 - concentração de melaço de cana (g L^{-1}); X_2 – concentração de água de maceração de milho (g L^{-1}); X_3 – concentração de peptona (g L^{-1}).

Considerando-se significativos os parâmetros com p – valores menores que 10% ($p \leq 0,1$) mostrados na Tabela 13 obteve-se a Equação 4.2, que representa o modelo quadrático com as variáveis codificadas da produção de ácido láctico em função das variáveis estudadas para *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

ATCC 11842. Assim, o termo linear da concentração de melaço de cana foi o único parâmetro significativo. Os outros parâmetros foram incorporados aos resíduos. O modelo apresentado neste segundo delineamento é uma equação linear.

$$\text{Ácido láctico (gL}^{-1}\text{)} = 12,45333 + 2,96187X_1 \quad [4.2]$$

A Figura 14 mostra os valores preditos pelo modelo contra os valores experimentais para melhor visualização da adequação do modelo.

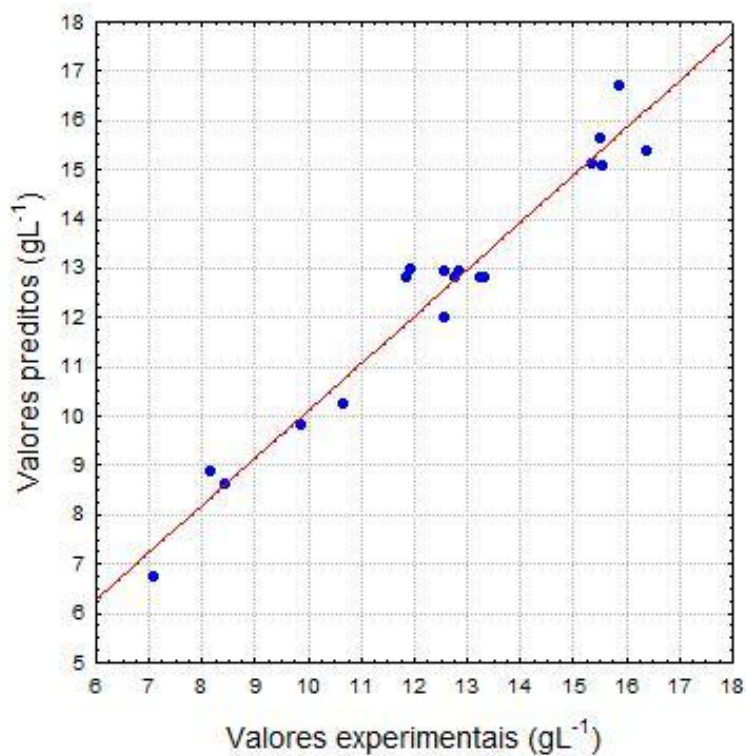


Figura 14: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais

É possível observar que o modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes, pois os pontos se situam próximos à reta de coeficiente angular 1 (Figura 14).

Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 14. Como o F calculado para a regressão foi altamente significativo ($p < 0,0001$), sendo 26,7 vezes maior que o F tabelado, e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 92\%$), podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta representada pela Figura 11. Além disto, os desvios relativos foram inferiores a 15%, (exceto para o ensaio 1) comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais (Tabela 12).

Tabela 14: ANOVA do modelo linear para predição da produção de ácido láctico (g L^{-1}) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Fonte de Variação	S.Q. ^a	G.L. ^b	Q.M. ^c	F calculado	p-valor
Regressão	119,8068	1,0	119,8068	187,8696	<0,0001
Resíduos	10,2034	16,0	0,63771		
Total	130,0102	17,0			

% variação explicada (R^2) = 92,151 $F_{1;16;0,05} = 4,494$

^a soma dos quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios.

Através da análise da superfície de resposta (Figuras 15 e 17) e curvas de contorno (Figuras 16 e 18), pode-se concluir que para as concentrações estudadas, a região ótima de maior produção de ácido láctico depende apenas da concentração de melaço de cana, sendo que o rendimento da produção é proporcional à concentração do substrato.

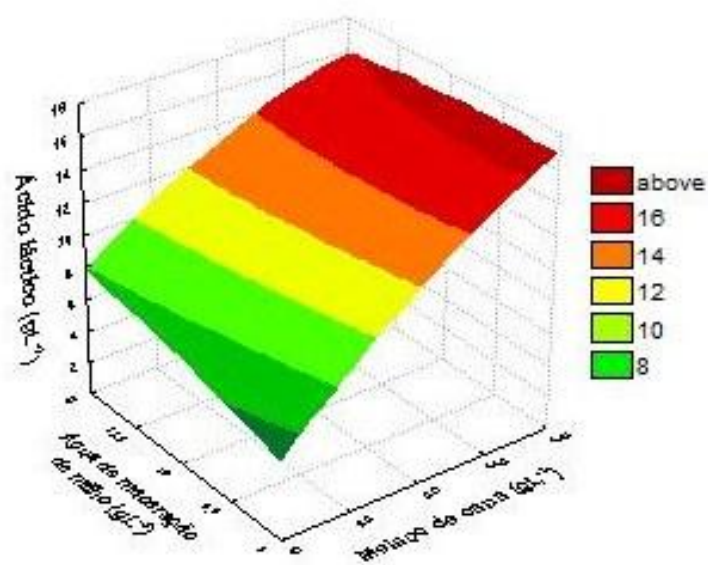


Figura 15: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

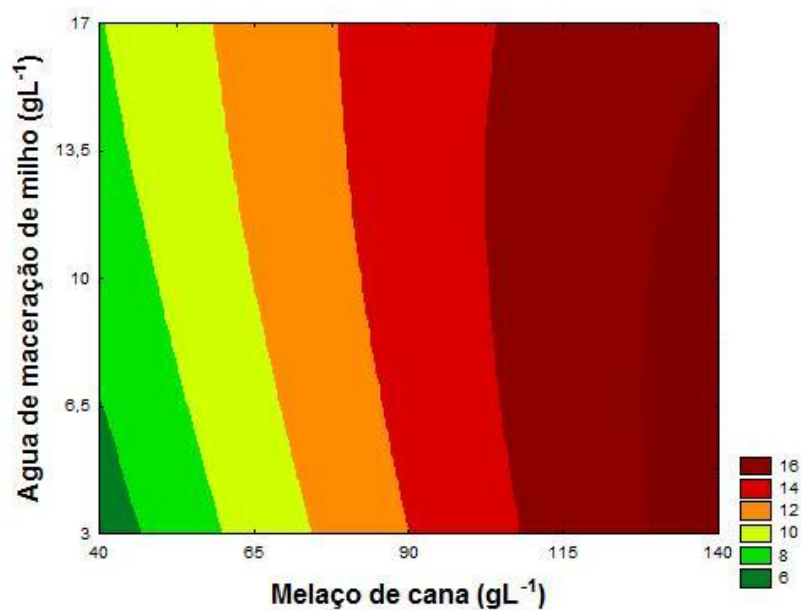


Figura 16: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

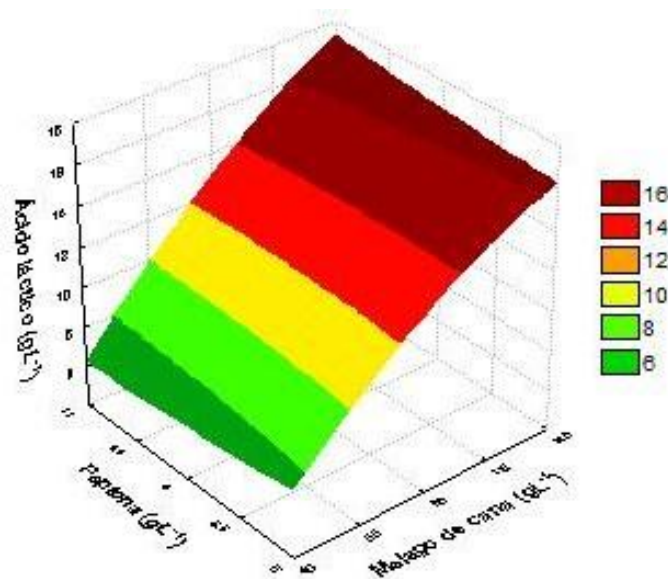


Figura 17: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e peptona por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

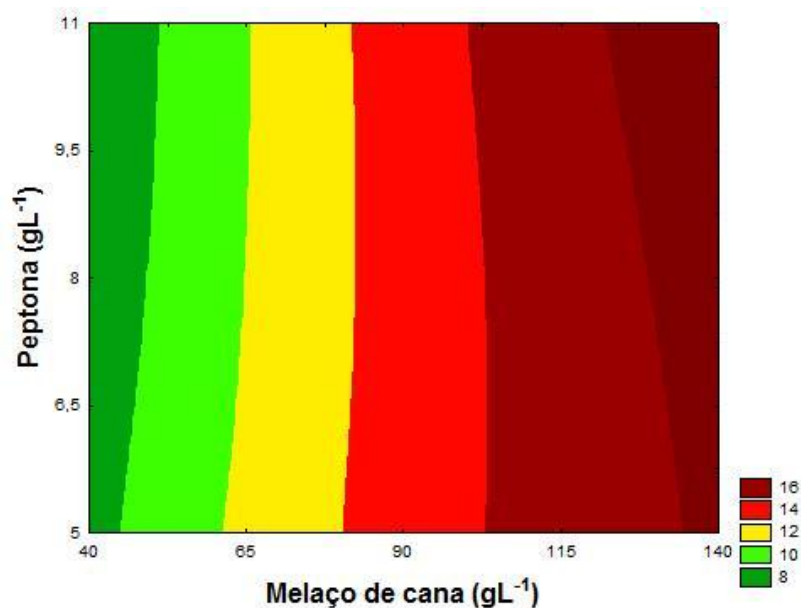


Figura 18: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e peptona por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

As combinações das concentrações de água de maceração de milho e peptona não são estatisticamente significativas. Mesmo mantendo suas concentrações nos níveis inferiores estudados, a produção de ácido láctico pode ser alta como demonstrou o ensaio 2. Entretanto, a análise do delineamento fatorial fracionado junto ao segundo delineamento composto central rotacional sugere que as fontes de nitrogênio são estatisticamente significativas, e que peptona como água de maceração de milho proporcionam ao meio esses nutrientes, sugerindo-se retirar a peptona e manter água de maceração de milho no meio.

Este raciocínio foi também considerado por LIU et al. (2010) após estudar cinco alternativas de fontes de nitrogênio com o objetivo de substituir peptona e extrato de levedura no meio MRS.

LIU et al. (2010) concluiu através da metodologia de delineamento fatorial fracionado que água de maceração de milho e broto de malte mostraram efeito significativo na produção de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* As.1.3. Assim, através delineamento composto central rotacional estabeleceram as concentrações ótimas do broto de malte e água de maceração de milho.

Observa-se que a produção de ácido láctico poderia ser ainda maior se houvesse um incremento da concentração de melaço de cana. Por isso foi proposta a realização de um terceiro delineamento composto central rotacional para estudar o efeito de concentrações maiores de melaço de cana e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, em ausência de peptona.

4.4.3. Determinações analíticas

O segundo DCCR foi acompanhado da análise das amostras coletadas após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação, mostrado nas Figuras (19), (20), (21) e (22).

Neste segundo planejamento a relação grama de ácido láctico por cada grama de substrato aumentou, mostrando um valor médio de 0,73. A relação foi

calculada com os dados obtidos das determinações analíticas de ácido láctico e açúcares redutores totais.

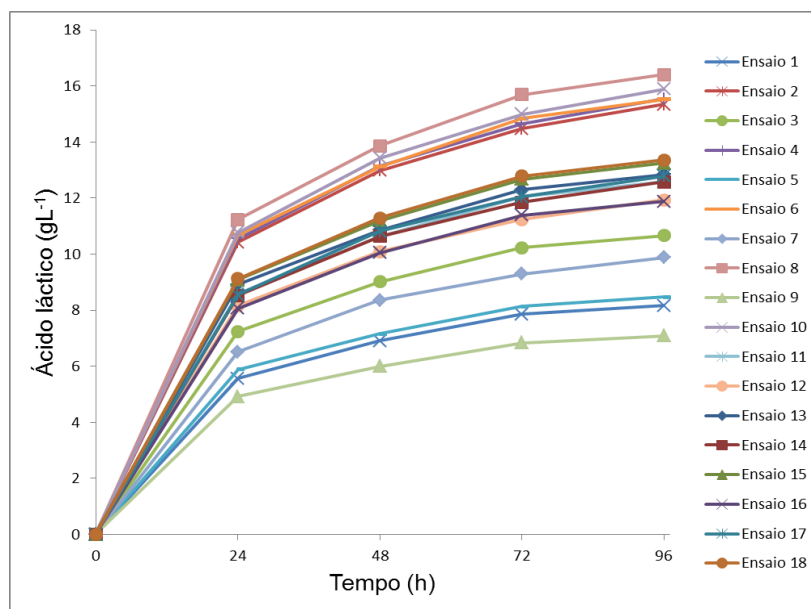


Figura 19: Produção de ácido láctico durante o processo fermentativo para os ensaios do segundo DCCR (2^3)

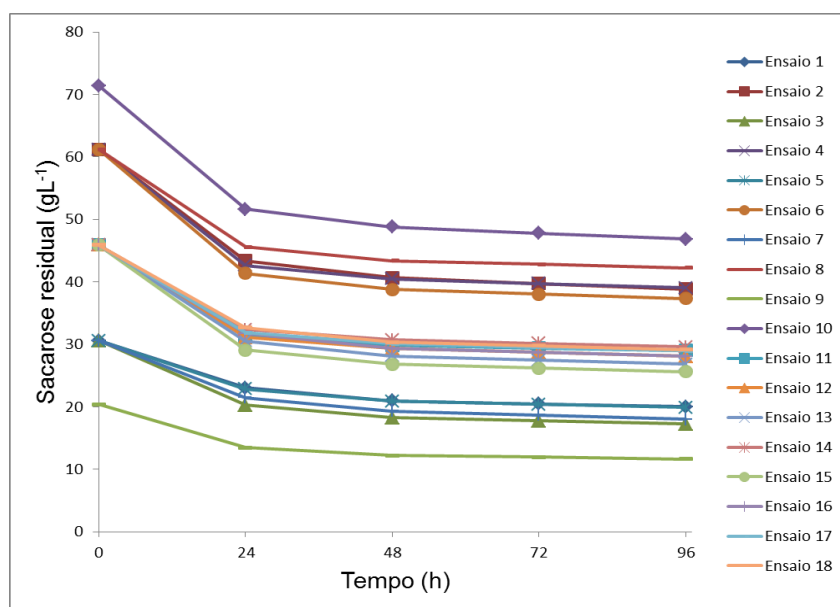


Figura 20: Concentração de sacarose residual após a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo dos ensaios do segundo DCCR (2^3)

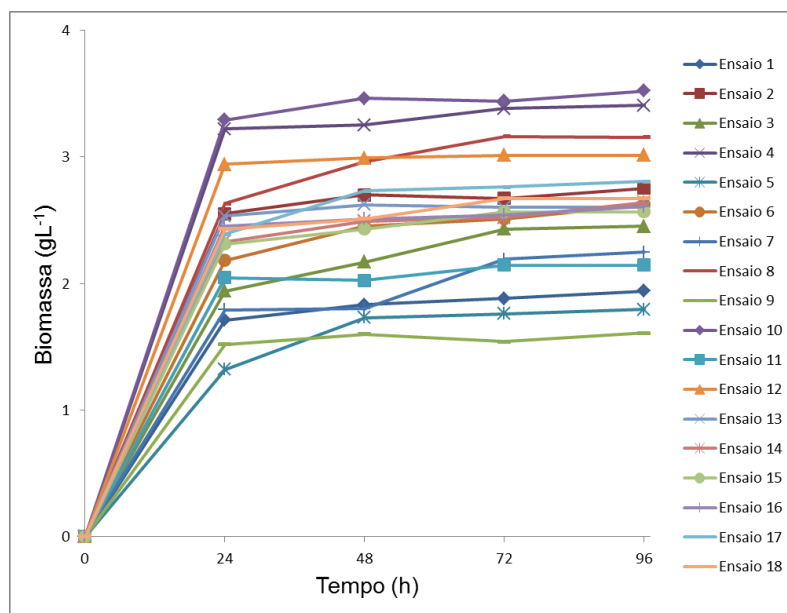


Figura 21: Concentração de biomassa seca após a produção de ácido láctico durante processo fermentativo dos ensaios do segundo DCCR (2³)

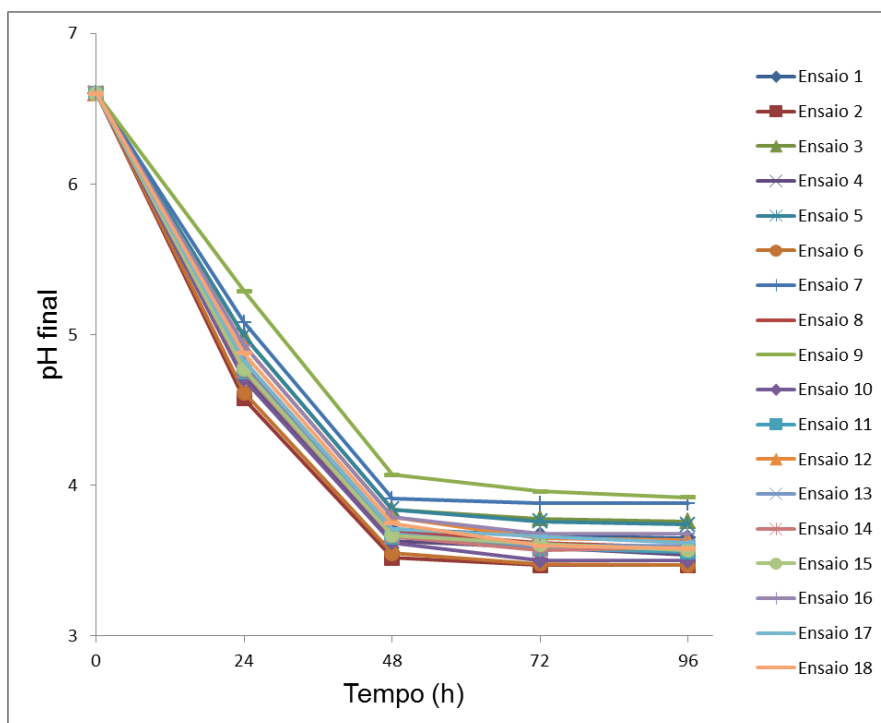


Figura 22: Valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico nos ensaios do segundo DCCR (2³)

As curvas observadas nas Figuras (19), (20), (21) e (22) mostram comportamento similar ao apresentado no primeiro delineamento composto central estudado. Neste segundo planejamento o tempo de fermentação foi prolongado até 96 horas.

A Figura 21 mostra a concentração de biomassa seca, que se encontram entre $1,5 \text{ gL}^{-1}$ (ensaio 9) até $3,5 \text{ gL}^{-1}$ (ensaio 10). Novamente a produção de ácido láctico se mostrou relacionada ao crescimento do microrganismo.

4.5. Terceiro delineamento composto central rotacional (DCCR) para a otimização da produção de ácido láctico

Em função das considerações expostas no item 4.4, foi realizado um terceiro delineamento composto central rotacional (DCCR) considerando como variáveis as concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho.

4.5.1. Resultados dos ensaios

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a produção de ácido láctico apresentadas na Tabela 15. O tempo de fermentação foi de 96 horas.

As melhores respostas para a produção de ácido láctico ocorreram nos ensaios 4 e 6, com $57,17$ e $55,74 \text{ gL}^{-1}$. Sendo, concentração de melaço de cana entre $240 - 265 \text{ gL}^{-1}$, e água de maceração de milho entre $10 - 14 \text{ gL}^{-1}$.

As menores respostas para a produção de ácido láctico ocorreram nos ensaios 1 e 5, com $38,19$ e $40,56 \text{ gL}^{-1}$. Sendo, concentração de melaço de cana entre $95 - 120 \text{ gL}^{-1}$, e água de maceração de milho entre $6 - 10 \text{ gL}^{-1}$.

Tabela 15: Matriz do terceiro DCCR contendo valores reais e codificados das variáveis, resposta sobre a produção de ácido láctico (gL^{-1}), valores preditos pelo modelo e desvios relativos.

Ensaio	X_1^a	X_2^b	A.L. ^c	A.L. predita ^d	Desvio Relativo ^e
1	-1 (120)	-1 (6)	38,19	44,90	-17,07
2	1 (240)	-1 (6)	43,62	44,04	-0,97
3	-1 (120)	1 (14)	48,57	46,33	4,61
4	1 (240)	1 (14)	57,17	59,51	-4,09
5	-1,4142 (95)	0 (10)	40,56	41,99	-3,52
6	1,4142 (265)	0 (10)	55,74	50,70	9,05
7	0 (180)	-1,4142 (4)	48,51	45,08	7,08
8	0 (180)	1,4142 (16)	55,48	57,02	-2,78
9	0 (180)	0 (10)	50,30	51,05	-1,49
10	0 (180)	0 (10)	51,31	51,05	0,51
11	0 (180)	0 (10)	51,11	51,05	0,12
12	0 (180)	0 (10)	53,20	51,05	4,04

^a concentração de melaço de cana (gL^{-1}); ^b concentração de água de maceração de milho (gL^{-1}); ^c ácido láctico (gL^{-1}); ^d valores de ácido láctico predito pelo modelo (gL^{-1}); ^e desvio relativo= $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

4.5.2. Análise estatística

A análise dos coeficientes de regressão das variáveis foi realizada utilizando o teste t de Student para determinar a significância estatística dos mesmos. Para o terceiro delineamento composto central rotacional foram analisados os fatores lineares e quadráticos para cada variável, bem como a interação entre elas ($X_1 \times X_2$) (Tabela 16). A análise foi realizada para amostras coletadas após 96 horas de fermentação.

Tabela 16: Coeficientes de regressão para a resposta de produção de ácido láctico (gL^{-1}) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Media	51,4800	1,9516	26,3780	<0,0001*
X_1 (L)	3,0797	1,3800	2,2317	0,0671*
X_1 (Q)	-2,4613	1,5429	-1,5952	0,1618*
X_2 (L)	4,2234	1,3800	3,0604	0,0222*
X_2 (Q)	-0,5388	1,5429	-0,3492	0,7389
$X_1 \times X_2$	3,5075	1,9516	1,7972	0,1224*

* $p \leq 0,20$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos; X_1 - concentração de melaço de cana (gL^{-1}); X_2 – concentração de água de maceração de milho (gL^{-1}).

Considerando-se significativos os parâmetros com p – valores menores que 20% ($p \leq 0,2$) mostrados na Tabela 16 obteve-se a Equação 4.3, que representa o modelo quadrático com as variáveis codificadas da produção de ácido láctico em função das variáveis estudadas para *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842. Assim, o termo quadrático da concentração de água de maceração de milho não foi significativo, eliminando-se do modelo e adicionando-se aos resíduos.

$$\text{Ácido láctico (gL}^{-1}\text{)} = 51,0490 + 3,0797X_1 + 4,2234X_2 - 2,3535X_1^2 + 3,5075X_1X_2 \quad [4.3]$$

Na Figura 23 pode-se observar os valores preditos pelo modelo contra os valores experimentais para melhor visualização da adequação do modelo.

É possível observar que o modelo gerou respostas próximas aos valores experimentais correspondentes, pois os pontos se situam próximos à reta de coeficiente angular 1 (Figura 23).

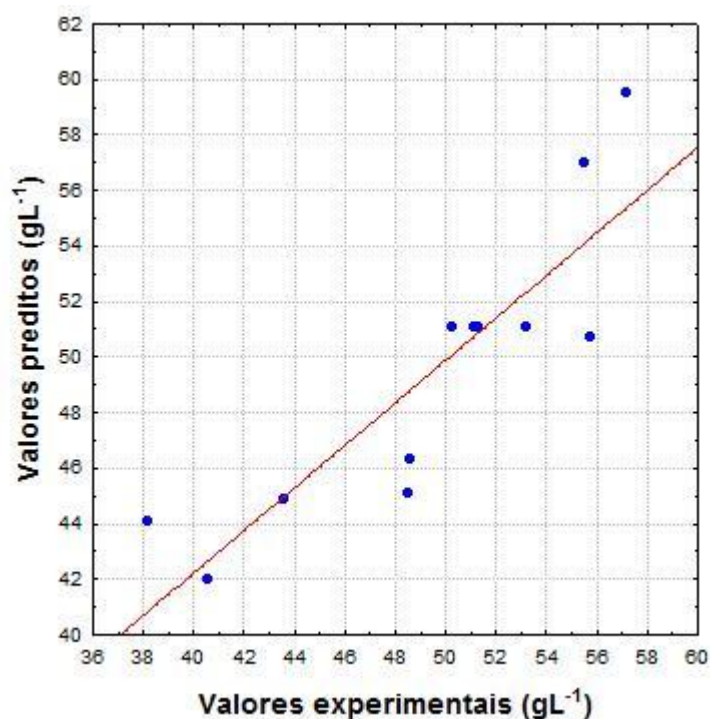


Figura 23: Valores preditos pelo modelo versus valores experimentais

Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 17.

Tabela 17: ANOVA do modelo quadrático para predição da produção de ácido láctico (gL⁻¹) por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Fonte de Variação	S.Q. ^a	G.L. ^b	Q.M. ^c	F calculado	p-valor
Regressão	304,7097	4,0	76,1774	5,7172	0,02293
Resíduos	93,2696	7,0	13,3242		
Total	397,0794	11,0			

% variação explicada (R^2) = 76,564 $F_{4;7;0,10} = 2,96$

^a soma de quadrados; ^b graus de liberdade; ^c quadrados médios.

Como o F calculado para a regressão foi significativo ($p < 0,05$), sendo maior que o F tabelado, e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 77\%$), pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 24.

Os desvios relativos foram inferiores a 10%, (exceto para o ensaio 1) comprovando o ajuste do modelo aos dados experimentais (Tabela 15).

Através da análise da superfície de resposta (Figura 24) e curvas de contorno (Figura 25), pode-se concluir que para as concentrações estudadas, a região ótima na produção de ácido láctico esta formada quando ambas as variáveis mostram seus níveis superiores de concentração.

A análise estatística deste terceiro delineamento composto central rotacional comprovou que a variável água de maceração de milho substituiu com sucesso às fontes de nitrogênio consideradas importantes na produção de ácido láctico (extrato de levedura e peptona) na fermentação de melaço de cana por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*.

ALTAF; NAVEENA; REDDY (2006) substituiu no meio MRS a peptona e extrato de levedura, as fontes de nitrogênio propostas foram lentilha vermelha e células de levedura de panificação. O substrato fermentado por *Lactobacillus amylophilus* GV6 foi amido (66% da concentração total de lentilha vermelha) produzindo ácido láctico na relação a 0,92 gramas por cada grama de substrato. No entanto, as concentrações de lentilha vermelha e células de levedura foram as duas estabelecidas ótimas na concentração de 10 gL^{-1} , concentrações diferentes destes nutrientes geraram um decréscimo do rendimento da produção de ácido láctico. A produção de ácido láctico no meio de cultivo proposto por ALTAF; NAVEENA; REDDY (2006) não gera interesse industrial. No entanto, os resultados obtidos na produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 a partir de melaço de cana, pode-se considerar de significativa importância industrial.

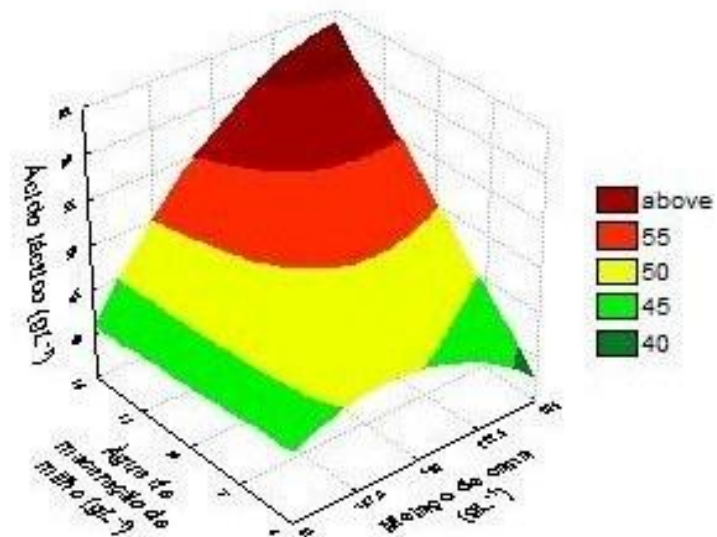


Figura 24: Superfície de resposta para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

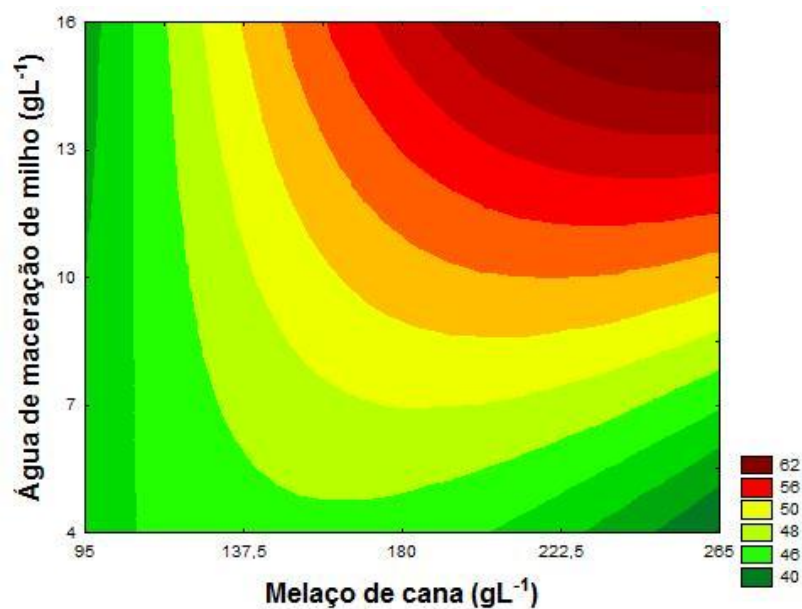


Figura 25: Curvas de contorno para produção de ácido láctico (gL^{-1}) em função das concentrações de melaço de cana e água de maceração de milho por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842.

DUMBREPATIL et al. (2007) estudaram três microrganismos (*Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130, *Enterococcus faecalis* RKY1 e *Lactobacillus delbrueckii* Uc-3) com o objetivo de avaliar capacidade de fermentar melaço de cana para produção de ácido láctico. Neste estudo *Lactobacillus delbrueckii* Uc-3 mostrou-se uma cepa eficiente com produtividade muito alta para a produção de ácido láctico a partir de uma alta concentração de melaço. A produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 neste terceiro delineamento assemelha-se ao *Lactobacillus delbrueckii* Uc-3.

Desde o primeiro delineamento até o terceiro DCCR a faixa de estudo da concentração de melaço de cana foi duplicada. A produção de ácido láctico desde o primeiro até o segundo DCCR incrementou-se 1,4 vezes e desde o segundo até o terceiro DCCR incrementou-se 3,4 vezes. Sugere-se então que o *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 seja também uma cepa eficiente em alta concentração de melaço de cana.

4.5.3. Determinações analíticas

O terceiro DCCR foi acompanhado da análise das amostras coletadas após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação, mostrado nas Figuras (26), (27), (28) e (29).

Neste terceiro delineamento a relação grama de ácido láctico por cada grama substrato se tem incrementado, mostrando um valor médio de 0,82. A relação foi calculada com os dados obtidos das determinações analíticas de ácido láctico e açúcares redutores totais.

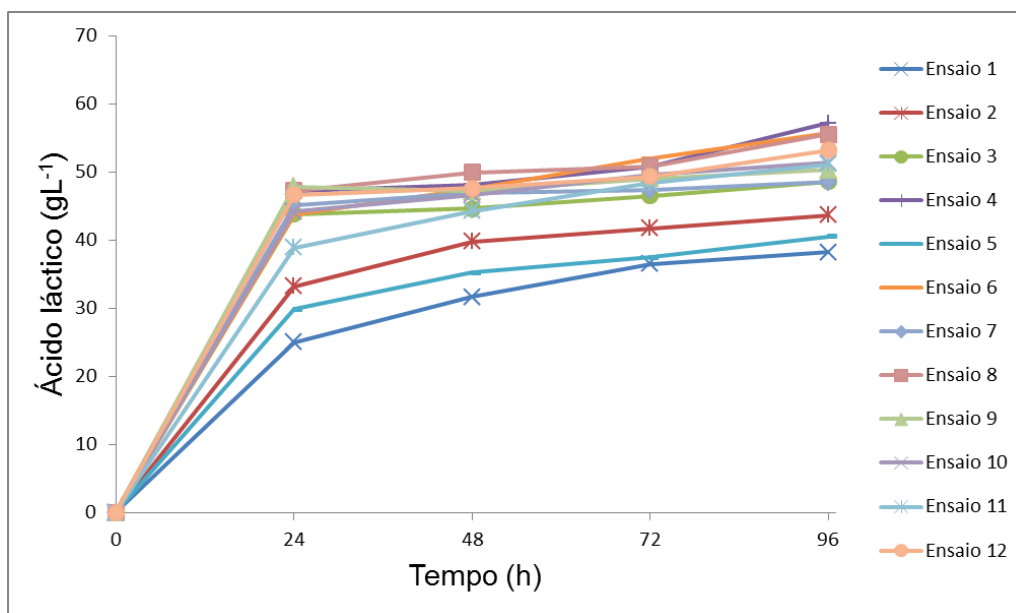


Figura 26: Produção de ácido láctico durante o processo fermentativo para os ensaios do terceiro DCCR (2^2)

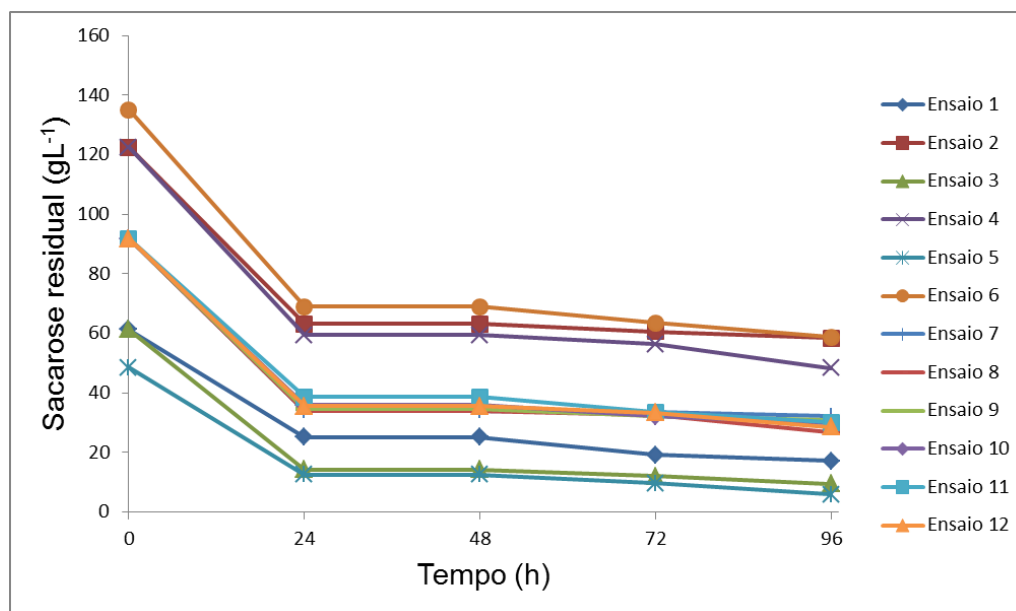


Figura 27: Concentração de sacarose residual após a produção de ácido láctico durante o processo fermentativo dos ensaios do terceiro DCCR (2^2)

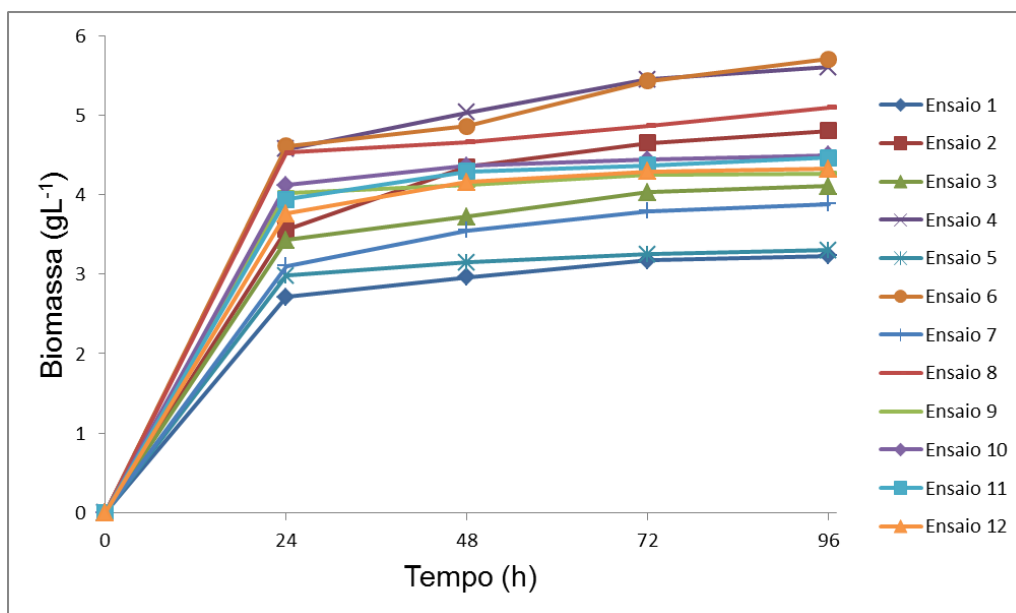


Figura 28: Concentração de biomassa seca após a produção de ácido láctico durante processo fermentativo dos ensaios do terceiro DCCR (2^2)

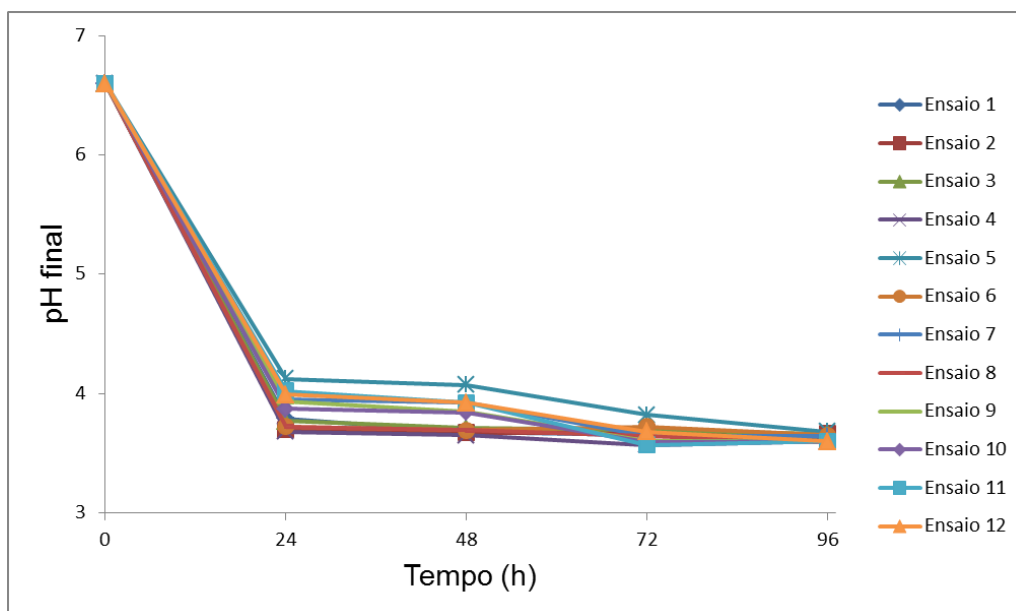


Figura 29: Valor de pH do meio de cultivo após a produção de ácido láctico nos ensaios do terceiro DCCR (2^2).

A Figura 28 mostra a concentração de biomassa seca neste terceiro delineamento, se encontram entre 3 gL⁻¹ (ensaios 1 e 5) até 6 gL⁻¹ (ensaio 6). Como observado anteriormente, a produção de ácido láctico mostrou-se associada ao crescimento do microrganismo.

5. CONCLUSÕES

O melaço de cana pode ser utilizado como substrato para a fermentação direta por *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* ATCC 11842 na produção de ácido láctico, não sendo necessária sua hidrólise prévia.

O delineamento fatorial fracionado permitiu definir mediante menor número menor de ensaios, que dentro das faixas de estudo das cinco variáveis (concentrações de melaço de cana, de água de maceração de milho, de peptona, de extrato de carne e de mono oleato de sorbitan) só quatro delas foram estatisticamente significativas.

A variável concentração de extrato de carne não apresentou efeito sobre a resposta ao nível de significância de 90%, o que levou à sua retirada da formulação do meio de cultura.

No primeiro delineamento composto central rotacional, as variáveis independentes foram concentração de melaço de cana e água de maceração de milho. A produção de ácido láctico evidenciou ser proporcional à concentração de melaço de cana.

O segundo delineamento composto central rotacional mostrou que a produção de ácido láctico é proporcional à concentração de melaço de cana.

Água de maceração de milho e peptona não foram estatisticamente significativos sobre a produção de ácido láctico ao nível de significância de 90% e uma poderia substituir à outra.

O terceiro delineamento composto central rotacional comprovou a capacidade da água de concentração de milho para conseguir a fermentação do melaço de cana sendo a única fonte de nitrogênio no meio.

A produção de ácido láctico máxima do primeiro delineamento foi de 11,71 gL⁻¹ (na concentração de 60 gL⁻¹ de melaço de cana), o segundo planejamento mostrou produção máxima de 16,40 gL⁻¹ (na concentração de 120 gL⁻¹ de melaço de cana) e no terceiro delineamento a produção de ácido láctico triplicou,

mostrando produção máxima de 55,74 gL⁻¹ (concentração de 240 gL⁻¹ de melaço de cana).

No terceiro delineamento composto central rotacional a produção de ácido láctico foi proporcional ao aumento das concentrações das variáveis estudadas, sendo recomendável estudar maiores concentrações destes componentes no meio, visando incrementar a produção de ácido láctico.

Logrou-se otimizar o meio de cultura para produção de ácido láctico, onde as fontes de carbono e nitrogênio serão subprodutos da agroindústria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTAF, M.D., B.J. NAVEENA, G. REDDY. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+)-lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 498–503, 2007.

CARDINAL, E.V., L.R. HEDRICK. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**. v. 172, p. 609–612, 1948.

CHIARINI, L., L. MARA, S. TABACCHIONI. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. **Applied Microbiology and biotechnology**. v.36, p.461-464, 1992.

CUI, F., Y. LI, C. WAN. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 1831–1836, 2011.

DATTA, R., S. P. TSAI, P. BONSIGNOR, S. MOON, J. FRANK, Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. **FEMS Microbiology reviews**. v. 16, p. 221–231, 1995.

DUMBREPATIL, A., M. ADSUL, S. CHAUDHARI, J. KHIRE, D. GOKHALE, Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 333–335, 2008.

HAULY, M. C. O., A. R. OLIVEIRA, A. S. OLIVEIRA. Lactic acid production by *L. curvatus* in sugarcane molasses. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 24, n. 1, p. 133-142, 2003.

HUJANEN M., Y.Y. LINKO. Effect of temperature and various nitrogen sources on L-(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 45, p. 307–313, 1996.

JOGLEKAR, H.G., I. RAHMAN, S. BABU, B.D. KULKARNI, A. JOSHI. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. **Separation and Purification Technology**. v. 52, p. 1–17, 2006.

JOHN R.P., K.M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 74, p. 524–534, 2007.

JOHN R.P., K.M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 759–763, 2006.

JOHN, R.P., G.S. ANISHA, K.M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnology advances**. v. 29, p. 145-152, 2009.

JOHN, R.P., K.M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. L(+)-Lactic acid recovery from cassava bagasse based fermented medium using anion exchange resins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 51, n. 6, p. 1241–1248, 2008.

JOHN, R.P., K.M. NAMPOOTHIRI, A.S. NAIR, A. PANDEY. L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**. v. 27, p. 1685–1688, 2005.

JOHN, R.P., R. K. SUKUMARAN, K.M. NAMPOOTHIRI, A. PANDEY. Statistical optimization of simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 36, p. 262–267, 2007.

KARP, S.G., A.H. IGASHIYAMA, P.F. SIQUEIRA, J.C. CARVALHO, L.P.S. VANDENBERGHE, V. THOMAZ-SOCCOL, J. CORAL, J-L. THOLOZAN, A. PANDEY, C.R. SOCCOL. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 1765-1772, 2011.

KWON, S., P.C. LEE, E.G. LEE, Y. K. CHANG, N. CHANG. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbial technology**. v. 26, p. 209-215, 2000.

LAWRENCE, A.J. Determination of lactic acid in cream. **The Australian Journal of Dairy Technology**. March, p. 14-15, 1975.

LIU, B., M.YANG, B. QI, X. CHEN, Z.SU, Y. WAN. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 212-219, 2010.

MICHELSON, T., K. KASK, E JÕGI, E. TALPSEP, I. SUITSO, A. NURK. L-(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with

Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis DSM 20073. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 861-867, 2006.

NANCIB, N., A. NANCIB, A. BOUDJELAL, C. BENSLIMANE, F. BLANCHARD, J. BOUDRANT, The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus*. **Bioresource Technology**. v. 78, p. 149-153, 2001.

NARAYANAN, N., P.K. ROYCHOUDHURY, A. SRIVASTAVA. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 7 (2), p. 167–178, 2004.

NARITA J, S. NAKAHARA, H. FUKUDA, A. KONDO. Efficient production of L-(+)-lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 97, n. 6, p. 423–425, 2004.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 375-380, 1944.

OH H., Y.J. WEE, J.S. YUN, S. H. HAN, S. JUNG, H.W. RYU, Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 1492–1498, 2005.

OHARA, H. Biorefinery, **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 62, p. 474–477, 2003.

OHKOUCHI Y, Y. INOUE. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. **Bioresource Technology**. v. 97, p. 1554–1562, 2006.

PETROV, K., Z. URSHEV, P. PETROVA. L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. **Food Microbiology**. v. 25, p. 550-557, 2008.

PLESSAS, S., L. BOSNEA, C. PSARIANOS, A.A. KOUTINAS, R. MARCHANT, I.M. BANAT. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 5951-5955, 2008.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

SÖDERGÅRD, A., M. STOLT. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. **Progress in Polymer Science**. v. 27, p. 1123–1163, 2002.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, v. LXX, n. 3, p. 599-612, 1926.

VARADARAJAN, S., D.J. MILLER. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. **Biotechnology Progress**. v. 15, p. 845–854, 1999.

WEE, Y.J., H.W. RYU. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 4262-4270, 2009.

WEE, Y.J., J.N. KIM, H.W. RYU. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology Biotechnology**. v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006.

WOICIECHOWSKI, A.L., S. NITSCHKE, A. PANDEY, C.R. SOCOOL. Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from cassava bagasse: an economic study. **Brazilian Archives Biology and Technology**. v. 45, n. 3, p. 393–400, 2002.

YU, L., T. LEI, X. RENA, X. PEI, Y. FENG. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 496-502, 2008.

YUN, J.S., Y.J. WEE, H.W. RYU. Production of optically pure L-(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33, p. 416–423, 2003.

ZHANG, Z.Y., B. JIN, J. M. KELLY. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 251-263, 2007.

7. ANEXOS

7.1. Curva padrão

7.1.1. Sacarose

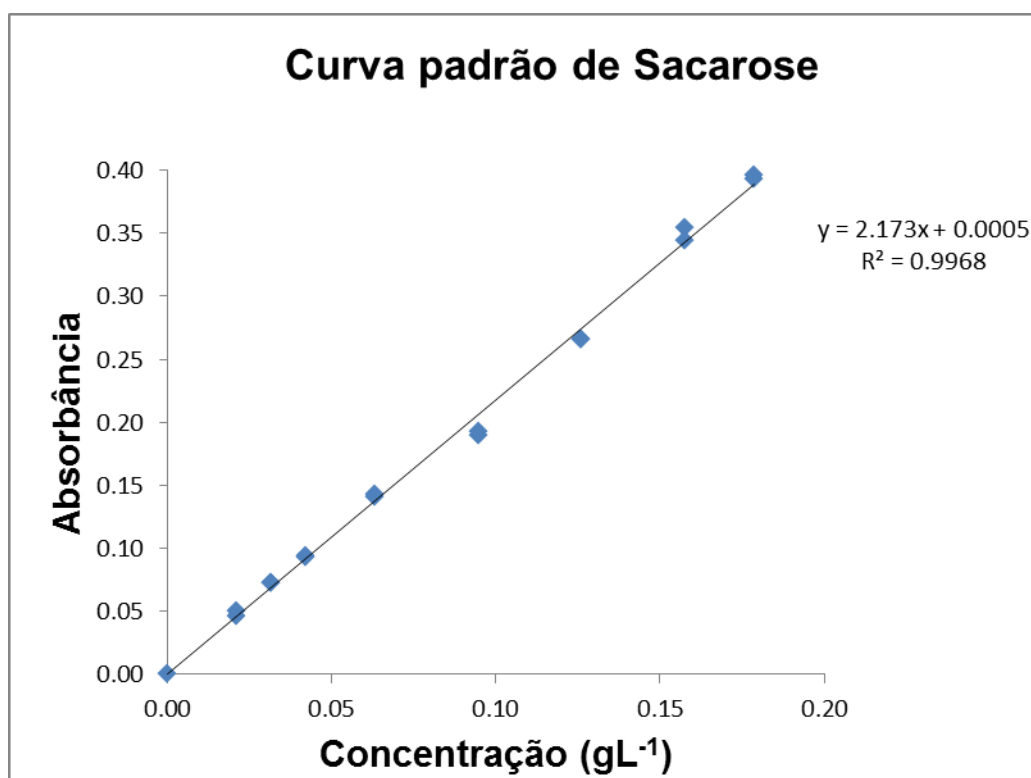


Figura 30: Curva padrão de Sacarose

7.1.2. Ácido láctico

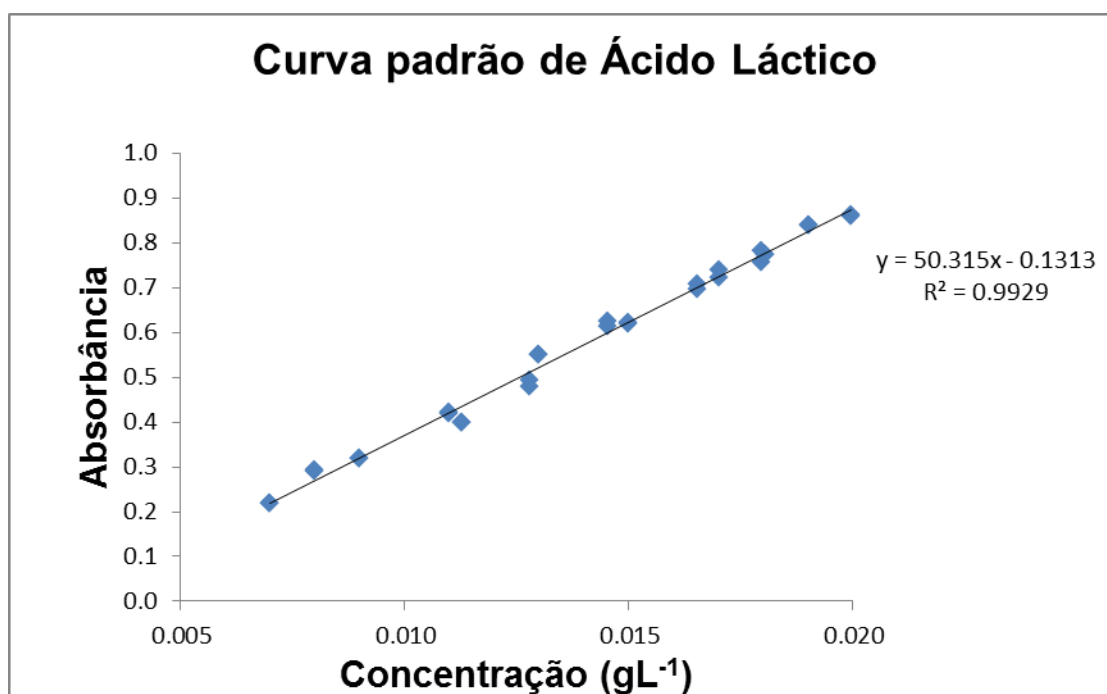


Figura 31: Curva padrão de Ácido láctico